

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Neuropathologische Untersuchungen
nach Kombination von Schädelhirntrauma und Femurfraktur
in der Maus

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Kirsten Jung
aus Frankfurt am Main

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

06.12.2022

*für meine Mutter,
es vergeht kein Tag, an dem ich sie nicht vermisse,
und für meine geliebte Schwester,
die mich bedingungslos unterstützt.*

Inhaltsverzeichnis	
INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
SONDERZEICHEN	VIII
DIAGRAMMVERZEICHNIS	IX
TABELLENVERZEICHNIS	X
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURDISKUSSION	3
2.1 DEFINITION DES POLYTRAUMAS	3
2.2 HISTORIE DES POLYTRAUMAS.....	3
2.3 HEUTIGER STAND UND KLASSIFIKATIONEN	5
2.3.1 <i>Abbreviated Injury Scale (AIS)</i>	6
2.3.2 <i>Injury Severity Score</i>	7
2.3.3 <i>New ISS</i>	7
2.3.4 <i>Maximum AIS</i>	8
2.4 PATHOPHYSIOLOGIE DES POLYTRAUMAS.....	8
2.4.1 <i>Definition des Schädelhirntraumas</i>	9
2.4.2 <i>Klinische Einteilung und Klassifikation der posttraumatischen Bewusstseinsstörung</i>	9
2.4.3 <i>Anatomisch-pathologische Klassifikation</i>	11
2.4.4 <i>Einteilung in primären und sekundären Hirnschaden</i>	11
2.4.5 <i>Zerebrale Veränderungen nach SHT</i>	14
2.4.6 <i>Periphere Veränderungen nach SHT</i>	21
2.4.7 <i>Definition der Femurfraktur</i>	22
2.4.8 <i>Morphologie des Knochens</i>	22
2.4.9 <i>Histologie des Knochens</i>	22
2.4.10 <i>Frakturzeichen</i>	23
2.4.11 <i>Frakturheilung</i>	23
2.5 TRAUMAREGISTER DGU®	25
2.6 EPIDEMIOLOGIE UND FOLGEN DES POLYTRAUMAS	26
2.7 VERLETZUNGSMUSTER.....	28
2.8 THERAPIE UND DIAGNOSTIK.....	29
2.9 PROGNOSE, LANGZEITERGEBNIS UND ÖKONOMISCHE AUSWIRKUNGEN	31
2.10 TIEREXPERIMENTE ALS MODELLE	32
3 ZIEL DER DISSERTATION	34
4 MATERIAL	35
4.1 GERÄTE	35
4.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	35

4.3	ARZNEIMITTEL	36
4.4	CHEMIKALIEN UND PUFFER.....	36
4.5	ANTIKÖRPER	37
4.5.1	<i>Primäre Antikörper</i>	37
4.5.2	<i>Sekundäre Antikörper</i>	37
4.6	KITS.....	37
4.7	SOFTWARE.....	37
4.8	HERGESTELLTE LÖSUNGEN	38
4.9	PRIMER UND SONDEN	39
5	METHODEN.....	40
5.1	VERSUCHSPLANUNG	40
5.1.1	<i>Versuchstiere</i>	40
5.1.2	<i>Versuchsaufbau</i>	40
5.1.3	<i>Studiendesign</i>	41
5.2	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	43
5.2.1	<i>Haltungsbedingungen</i>	43
5.2.2	<i>Operationsvorbereitung</i>	43
5.2.3	<i>Anästhesie</i>	43
5.2.4	<i>Kraniotomie</i>	44
5.2.5	<i>Controlled Cortical Impact (CCI)</i>	44
5.2.6	<i>Femurfraktur</i>	46
5.2.7	<i>Scheineingriff</i>	47
5.2.8	<i>Röntgen</i>	47
5.3	POSTOPERATIVE PHASE.....	47
5.3.1	<i>Aufwachphase und postinterventionelle Haltung der Tiere</i>	47
5.3.2	<i>Neurologische Testung</i>	48
5.3.3	<i>Euthanasie und Präparation</i>	51
5.3.4	<i>Kryosektion und Probengewinnung</i>	51
5.3.5	<i>Histologische Datenerhebung</i>	52
5.3.6	<i>Genexpressionsanalyse</i>	57
5.3.7	<i>Immunoblot</i>	61
5.3.8	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i>	62
5.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG DER DATEN	63
6	ERGEBNISSE.....	64
6.1	VERHALTENSBIOLOGISCHE TESTUNG	64
6.1.1	<i>Neurological Severity Score - Die Kombination von Schädelhirntrauma und Femurfraktur hat einen Effekt auf die neuromotorische Beeinträchtigung der Versuchstiere</i>	64
6.1.2	<i>Beinbelastungsscore</i>	66
6.1.3	<i>Auswertung des Open Field Tests</i>	67
6.1.4	<i>Auswertung des Körpergewichtes</i>	69

6.2	HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	71
6.2.1	<i>Auswertung des Schadensvolumens</i>	71
6.2.2	<i>Auswertung der Gyrus Dentatus Messung</i>	72
6.2.3	<i>Auswertung der immunhistochemischen Färbung</i>	73
6.3	GENEXPRESSIONSANALYSE	75
6.4	WESTERN BLOT	76
6.4.1	<i>Nachweis von GFAP im Hirngewebe</i>	76
6.4.2	<i>Proteinkonzentrationsbestimmung von Progranulin und Osteopontin im Plasma</i>	77
6.4.3	<i>Progranulin</i>	77
6.4.4	<i>Osteopontin</i>	78
7	DISKUSSION	79
7.1	DAS POLYTRAUMA-MODELL	79
7.2	DIE MAUS ALS VERSUCHSTIER	81
7.3	VERHALTENSBIOLOGISCHE TESTUNG	82
7.3.1	<i>Klinische Untersuchungsparameter</i>	82
7.3.2	<i>Neurological Severity Score</i>	83
7.3.3	<i>Beinbelastungsscore</i>	84
7.3.4	<i>Open Field Test</i>	85
7.4	BEWERTUNG DER HISTOLOGISCHEN FÄRBUNGEN	85
7.4.1	<i>Bewertung des Schadensvolumens</i>	85
7.4.2	<i>Bewertung der immunhistologischen Färbung</i>	86
7.5	BEWERTUNG DER GENEXPRESSIONSANALYSE	87
7.6	BEWERTUNG DES ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS (ELISA)	88
7.7	SCHLUSSFOLGERUNG	89
7.7.1	<i>Auswirkungen der FF auf neurologische Defizite</i>	89
7.7.2	<i>Auswirkung der FF auf das Läsionsvolumen und die Inflammation</i>	90
7.7.3	<i>Auswirkungen der FF auf die Genexpression</i>	91
7.7.4	<i>Auswirkungen der FF auf die Proteinkonzentration von PGRN und OPN im Plasma</i>	91
8	ZUSAMMENFASSUNG	92
9	LITERATURVERZEICHNIS	94
10	DANKSAGUNG	116
11	LEBENS LAUF	118

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
ADP	Adenosindiphosphat
AEB	<i>Anxiety expression behavior</i> (engl.)
AIS	<i>Abbreviated Injury Scale (AIS)</i> (engl.)
AK	Antikörper
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (engl., deutsch: Varianzanalyse)
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> (lat., deutsch: destilliertes Wasser)
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BBS	Beinbelastungsscore
BE	Belgien
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBF	<i>Cerebral blood flow</i> (engl., deutsch: zerebraler Blutfluss)
CCI	<i>Controlled cortical impact</i> (engl.)
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i> (engl.)
cf	<i>Cellfree</i> (engl., deutsch: zellfrei)
CH	Schweiz
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlendioxid
CPP	<i>Cerebral perfusion pressure</i> (engl., deutsch: zerebraler Perfusionsdruck)
CRP	C-reaktives Protein
CVR	<i>Cerebrovascular resistance</i> (engl., deutsch: zerebrovaskulärer Gefäßwiderstand)
DAMPS	<i>Damage-associated molecular patterns</i> (engl.)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
d.h.	das heißt
DE	Deutschland
DG	<i>Dentate gyrus</i> (engl., deutsch: Gyrus dentatus)
DGU	Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
DK	Dänemark
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (engl., deutsch: Desoxyribonukleinsäure, DNS)

dpi	<i>Days post injury</i> (engl.)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (engl.)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (engl.)
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i> (lat., deutsch: und andere)
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
FF	Femoral fracture, Femurfraktur
FI	Finnland
g	g-Kraft, Gramm
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCL	<i>Granule cell layer</i> (engl.)
GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i> (engl., deutsch: Glasgow Koma Skala)
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> (engl., deutsch: saures Gliafaserprotein)
ggfs.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GOS	<i>Glasgow Outcome Scale</i> (engl.)
Grn	Granulin
h	Stunde
i.p.	intraperitoneal
i.S.	im Sinne
Iba-1	<i>Ionized calcium-binding adapter molecule 1</i> (engl.)
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> (engl.)
ICP	<i>Intracranial pressure</i> (engl., deutsch: intrakranialer Druck)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
ISS	<i>Injury Severity Score</i> (engl.)
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilo Volt
l	Liter
m	Meter
M	Molar
MAIS	<i>Maximum abbreviated Injury Scale</i>

MAP	<i>Mean arterial pressure</i> (engl., deutsch: mittlerer arterieller Blutdruck)
MD	<i>Middle dose</i> (engl., deutsch: Mitteldosis)
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i> (engl.)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOF	<i>Multi organ failure</i> (engl., deutsch: Multiorganversagen)
MRC1	<i>Mannose receptor C-type 1</i> (engl.)
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (engl.)
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
n	Anzahl untersuchter Individuen
NaCl	Natriumchlorid
NGS	<i>Normal goat serum</i> (engl.)
NISS	<i>New Injury Severity Score</i>
NL	Niederlande
nm	Nanometer
NSS	<i>Neurological Severity Score</i> (engl., deutsch: neurologische Defizitwertung)
o.g.	oben genannt
O₂	Sauerstoff
OFT	<i>Open Field Test</i> (engl.)
OP	Operation
OPN	Osteopontin
OT	Objektträger
PaCO₂	Arterieller Kohlenstoffpartialdruck
PaO₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PGRN	Progranulin
PLA	Phospholipase
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i> , (engl.)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (engl., deutsch: Ribonukleinsäure, RNS)

RNase	Ribonuklease
ROI	<i>Region of interest (engl.)</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>Rounds per minute (engl.)</i>
RT	Raumtemperatur
rT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
s.u.	siehe unten
SAP	<i>Stretch attend posture, (engl.)</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, (engl.)</i>
SEM	<i>Standard error of mean, (engl., deutsch: Standardfehler)</i>
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome, <i>(engl.)</i>
sog.	so genannt
SPP1	<i>Secreted phosphoprotein 1</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline, (engl.)</i>
TJ	<i>Tight junction (engl.)</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
TNW	TraumaNetzwerk Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UK	<i>United Kingdom (engl., deutsch: Vereinigtes Königreich)</i>
USA	<i>United States of America (engl., deutsch: Vereinigte Staaten von Amerika)</i>
uvm.	und viele mehr
v.a.	vor allem
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor (engl.)</i>
WHO	<i>World Health Organization (engl.)</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

Sonderzeichen

$>$	größer oder gleich
$<$	kleiner oder gleich
$+/-$	plus/minus
2	Quadrat
3	Kubik
α	alpha
β	beta
μ	mü

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Ergebnisse des Neurological Severity Scores	64
Diagramm 2: Ergebnisse des Beinbelastungsscore (BSS)	66
Diagramm 3: Darstellung der zurückgelegten Strecke	67
Diagramm 4: Darstellung der Durchschnittsgeschwindigkeit	67
Diagramm 5: Ergebnisse der Aufstellversuche (rearing + supported rearing)	68
Diagramm 6: Ergebnisse der SAP-Frequenz	68
Diagramm 7: Ergebnisse des AEBs	69
Diagramm 8: Ergebnisse des Körpergewichts	70
Diagramm 9: Ergebnisse des Läsionsvolumens	71
Diagramm 10: Ergebnisse der Gyrus Dentatus Messung	72
Diagramm 11: Ergebnisse der Iba-1 Immunzell Auswertung	73
Diagramm 12: Ergebnisse der GFAP- Immunzell Auswertung	74
Diagramm 13: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse	75
Diagramm 14: Ergebnisse der Proteinkonzentration von GFAP	76
Diagramm 15: Darstellung eines Western Blot	76
Diagramm 16: Ergebnisse der Progranulin Bestimmung	77
Diagramm 17: Darstellung der Osteopontin Bestimmung	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Definitionen für schwerverletzte Unfallopfer	6
Tabelle 2: Schweregradklassifikation der Abbreviated Injury Scale.....	7
Tabelle 3: Schweregrad des Schädelhirntraumas nach Tönnis und Loew 1953 (50).....	9
Tabelle 4: Glasgow Coma Scale.....	10
Tabelle 5: Einteilung der Schweregrade anhand der GCS	10
Tabelle 6: Überblick der verschiedenen Zytokine mit Entstehungsort und Funktion (136, 137)	19
Tabelle 7: Verteilung der Verletzungen aller erfassten Patientenfälle	28
Tabelle 8: Anteil relevanter verletzter Patienten (AIS \geq 3) pro Körperregion	29
Tabelle 9: Glasgow Outcome Scale und neurologisches Behandlungsergebnis.....	32
Tabelle 10: Verwendete Primer und Sonden	39
Tabelle 11: Gruppeneinteilung	42
Tabelle 12: Pipettierschema für PCR.....	61

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: J. D. Larrey - eine große Figur der Kriegschirurgie © Fuzeau Philippe	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des primären und sekundären Hirnschadens.....	11
Abbildung 3: Pathophysiologie des SHT.....	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Monroe-Kelli-Doktrin. Modifiziert nach (1,2).....	15
Abbildung 5: Berechnung des zerebralen Perfusionsdruckes (CPP).....	16
Abbildung 6: Verletzungsmuster im TR-DGU	29
Abbildung 7: CCI Arbeitsplatz	44
Abbildung 8: Versuchsaufbau des Controlled Cortical Impact (CCI)	45
Abbildung 9: Operatives Vorgehen bei der Frakturierung des Femurs.....	46
Abbildung 10: Erreichen einer Femurfraktur mit Hilfe eines 200 g schweren Gewichts, modifiziert von (222).....	46
Abbildung 11: Repräsentative Darstellung eines Röntgenbildes eines Versuchstieres mit Osteosynthetisch versorgte Femurfraktur rechts. Skalierung: 1 cm.	47
Abbildung 12: Frakturkontrolle mittels mobilen Röntgengeräts.....	47
Abbildung 13: Walking Beam Test	49
Abbildung 14: Gefrierpräparat 5 Tage nach CCI Trauma	51
Abbildung 15: Repräsentative Darstellung der Gehirnschnitte nach Nissl-Färbung	52
Abbildung 16: Berechnung des Schadensvolumen (VA) in mm ³	53
Abbildung 17: Repräsentative Darstellung des Körnerzellbandes	54
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Immunfluoreszenz Färbung	56
Abbildung 19: Repräsentative Darstellung der ipsi- und kontralateralen Immunfluoreszenzfärbung	56
Abbildung 20: Berechnung des Reinheitsgrades	58
Abbildung 21: Amplifikationskurve einer qPCR.....	60

1 Einleitung

Die WHO propagierte, dass Verkehrsunfälle weltweit die Haupttodesursache von Kindern und jungen Erwachsenen zwischen fünf und 29 Jahren seien (1). Als mögliche Ursache hierfür sind die Zunahme des motorisierten Verkehrs und die bislang unzureichenden Maßnahmen der Verkehrssicherheit zu sehen (1). Auch wenn im März 2022 die Anzahl der registrierten Verkehrsunfälle und Verkehrstoten in Deutschland weiterhin auf einem historischen Tiefstand verbleiben und sich die Überlebenschancen Schwerstverletzter in den letzten 30 Jahren zunehmend verbessert hat, bleibt das SHT die Hauptursache für Tod oder lebenslange Behinderung der unter 45-Jährigen in Deutschland (2-6). Die große Anzahl der überlebenden Patienten in Deutschland mit dauerhaften Unfallschäden steigt aufgrund des Fortschrittes in der präklinischen und klinischen Versorgung. Dem Klinikaufenthalt schließen sich oftmals langwierige Regenerationsprozessen an, es kommt zu langen Ausfallzeiten, keiner vollständigen Genesung und bei 40 % der Patienten mit einem schweren Schädelhirntraumata (SHT) zu schwersten Behinderungen oder dem Tod (7). Dabei belaufen sich die gesamtgesellschaftlichen Kosten für Patienten mit einem SHT in Deutschland auf ca. 2.5 Milliarden Euro, für polytraumatisierte Patienten auf etwa 15 Milliarden Euro (8-10). Daten aus den USA gehen davon aus, dass es durch ein Trauma mit Todesfolge zu einem mittleren Verlust von 35 Lebensjahren kommt. Im Vergleich dazu liegt der Verlust durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei 12 - 13 Lebensjahren und durch Neoplasien bei ca. 16 Jahren. Die Daten verdeutlichen die enorme sozioökonomische Bedeutung des Polytraumas (11, 12).

Laut Definition ist das Polytrauma als Verletzungen mehrerer Körperregionen oder Organsysteme zu sehen, wovon mindestens eine oder die Kombination dieser Verletzungen für den Patienten lebensbedrohlich ist (13). Das SHT ist hierbei die dominierende Verletzung, wengleich Verletzungen von Extremitäten ebenfalls häufig zu beobachten sind (14). Beim SHT kommt es zu einem zweiphasigen Schadensverlauf. Beim Primärsult handelt es sich um einen irreversiblen Schaden, welcher keiner therapeutischen Intervention zugänglich ist und von der Schwere des initialen Traumas abhängig ist. Daher liegt das Hauptaugenmerk aktueller Grundlagenforschungen auf dem Verstehen der pathophysiologischen Vorgänge des Sekundärschadens. Diese sekundären Prozesse beinhalten eine neuroinflammatorische Reaktion mit einer Aktivierung des Immunsystems, dessen Ausmaß abhängig von der Ausprägung der Verletzung ist (15). Gegenwärtige Therapien dienen alleine der symptomatischen Sicherung der Vitalparameter und der Aufrechterhaltung und Verbesserung des Ist-Zustandes (16). Ein Eingriff der Therapie in die Signalwege der pathophysiologischen Vorgänge ist aufgrund von unzureichenden Forschungsergebnissen bislang noch nicht möglich, hierbei wäre insbesondere die Entwicklung therapeutischer Möglichkeiten zur Reduzierung des Ausweitens des sekundären Hirnschadens erstrebenswert.

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht das Etablieren eines kombinierten Modells für ein

offenes SHT und einer Extremitätenfraktur an der Maus, um die frühen pathologischen Auswirkungen besser zu verstehen. Anhand dieses Modells sollen dann ausgewählte Faktoren mit potenziellem Einfluss auf die Hirnpathologien hinsichtlich ihrer Regulation charakterisiert werden.

Zurückliegende Studien experimenteller Modelle für geschlossene oder offene SHT in der Maus weisen auf eine verstärkte histopathologische Hirnschädigung hin, wenn zugleich eine geschlossene Fraktur der Tibia erfolgte (17-19). Eine erhöhte Permeabilität der Bluthirnschranke sowie erhöhte Serumspiegel proinflammatorischer Zytokine werden hier als mögliche Ursachen für die dabei beobachtete verstärkte Hirnschädigung durch Neuroinflammation diskutiert (17, 18). Des Weiteren wurde festgestellt, dass Knochenfrakturen zu einer Mobilisation von Knochenmarks-eigenen Immunzellen und deren Ansammlung in Schadensarealen sorgen (18). Interessanterweise wurden hinsichtlich der Knochenheilung nach experimentellem SHT in der Maus und Ratte gegensätzliche Effekte beobachtet (20, 21). Nach Hirnverletzungen soll es zu einer Ausschüttung osteogener Faktoren kommen und so die Knochenheilung stimuliert werden (22). Somit können abhängig vom Ort der Freisetzung zirkulierende Zellen oder inflammatorische Mediatoren schädigende oder günstige Effekte auf die Hirnschädigung respektive Knochenheilung nehmen.

Jedoch gibt es bis heute nur wenige experimentelle Studien am Mausmodell, die erforscht haben, inwieweit die Knochenfrakturen die Verletzungen des Gehirns nach SHT beeinflussen. Für die frühe Phase nach Polytrauma gilt sogar, dass es bisher noch keinerlei Studien gibt, welchen diesen Aspekt näher betrachten. Es besteht ein unzureichendes Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie, der wechselseitigen Beeinflussung von Schädelhirnverletzungen und extrakranieller Traumata, wie einer Femurfraktur. Aufgrund der oben aufgeführten enormen sozioökonomischen sowie medizinischer Wichtigkeit dieser Kombinationsverletzungen, ist die Grundlagenforschung in diesem Bereich von grundlegender Bedeutung, um zukünftige Therapieansätze herauszuarbeiten und zu etablieren.

2 Literaturdiskussion

2.1 Definition des Polytraumas

Der Begriff „Polytrauma“ wurde in der Gegenwart maßgeblich von Professor Dr. Harald Tscherne, dem ersten Lehrstuhlinhaber für Unfallchirurgie in Deutschland an der Medizinischen Hochschule Hannover (1971 - 2000), beeinflusst. Dieser definierte das Polytrauma als eine Verletzung oder die Kombination mehrerer Verletzungen, die für den Betroffenen lebensbedrohlich ist (13, 23). Ein Polytrauma entsteht in der Regel im Rahmen eines schweren Unfalls und führt stets zu einem klinischen Notfall (ca. 1 % aller Notarzteinsätze), dabei enden bis zu 20 % aller Polytrauma tödlich (24). Eine weitere Definition von Wanner und Trentz beschreibt das Polytrauma als ein Syndrom von Verletzungen mehrerer Körperregionen oder Organe definierten Schweregrades, welches zu konsekutiven Systemreaktionen mit Funktionsstörungen oder Versagen primär nicht verletzter Organe oder Defensivsystem führen kann (25). International hat sich die Definition nach dem Injury Severity Score (ISS) durchgesetzt, welcher einen polytraumatisierten Patienten mittels einem $ISS \geq 16$ definiert (26-28). Diesen Definitionen ist gemeinsam, dass sie den Gesichtspunkt einer möglichen Kombination verschiedener Verletzungen und die potenzielle Lebensbedrohung betrachten. Eine detaillierte Beschreibung der Klassifikation und weiterer Definitionen finden sich im *Kapitel 2.3 Heutiger Stand und Klassifikation*.

2.2 Historie des Polytraumas

Der Begriff Mehrfachverletzungen bzw. Polytrauma existierte laut Aufzeichnungen schon während der trojanischen Kriege (500 v. Chr.) (29). Homer berichtete in seiner Ilias, dass die Prognose für „schwerverletzte Helden schlecht sei und dieser lediglich zum Sterben unter einen Baum gelegt werden könne, um zuletzt aufs schwarze Schiff gebracht zu werden“ (29, 30). Polytraumatisierte hatten damals eine meist infauste Prognose und die Überlebenschance lag bei 20 % (30). Die chirurgische Versorgung der überwiegend durch kriegerische Auseinandersetzungen entstandenen Wunden war oft nur rudimentär vorhanden und somit verstarben die Patienten an Blutverlusten und den sich anschließenden Wundinfektionen. Die zu dieser Zeit noch fehlende antibiotische Therapie und der fehlende Tetanusimpfschutz sind Gründe für die Entstehung der zum Teil unkontrollierbaren und zum Tode führenden Begleitinfektionen (31-34). Die Sterblichkeit konnte im Laufe der Geschichte durch verschiedene Verfahren und getroffene Vorkehrungen reduziert werden. Mit der Organisation der Unfallversorgung durch die Römer wurde die Prognose der Mehrfachverletzten erstmals entscheidend verbessert (30). Jedoch lag die Letalität während der markomannischen Kriege (167-75 v. Chr.) weiterhin bei über 70 % (30). Ferner erlagen während des Hundertjährigen Krieges zwischen England und Frankreich (1339-1453) die meisten polytraumatisierten Patienten (ca. 65 %) noch immer ihren

Verletzungen (29). Erste Verbesserungen in der Behandlung von Mehrfachverletzten erreichte Dominique J. Larrey, erster Heereschirurg Napoleons während der Napoleonischen Kriege (1792) (30).

Die damals feldfernen Versorgungsstrukturen von Schwerverletzten stellte Larrey und seine Kollegen vor eine große Herausforderung, da die zeitnahe Versorgung der Schwerverletzten nicht gewährleistet werden konnte. Larrey führte daraufhin die sogenannten „fliegenden Lazaretts“ ein – die erste Version des heutigen Rettungswesens (35). Er half in der Primärversorgung auf dem Schlachtfeld und lies die verletzten Soldaten mittels Kamelen in Ägypten oder bepackten Eseln in den Alpen vom Schlachtfeld bringen (33). Er realisierte, wie wichtig die Akutversorgung der Schwerverletzten war und erkannte die Folgen von inneren Blutungen nach stumpfen Bauchtraumata oder des traumatischen Schocks. Die Letalität war zu diesem Zeitpunkt weiterhin hoch, konnte aber durch die von Larrey ergriffenen Maßnahmen auf 50 % gesenkt werden (30). Erst im vergangenen Jahrhundert hat die Behandlung polytraumatisierter Patienten einen Wandel erfahren. 1922 spielte das Polytrauma noch eine nachrangige Rolle, damals erachtete die chirurgische Elite die Behandlung Unfallverletzter als unwürdig (29, 31). 1922 wurde aus dieser Not heraus die Deutsche Gesellschaft für Unfallheilkunde gegründet. Die Prognose konnte in den darauffolgenden Jahren durch zahlreiche Fortschritte im prä- und innerklinischen Bereich gesteigert werden und somit wurde im Zeitraum von 1952 bis 1991 eine Senkung der Letalität um 50 % erreicht (36).



Abbildung 1: J. D. Larrey - eine große Figur der Kriegschirurgie © Fuzeau Philippe

2.3 Heutiger Stand und Klassifikationen

Schwere Verletzungen und deren Folgen stellen sowohl für das Unfallopfer als auch für die Notfallmedizinische Versorgung und die Gesellschaft ein wichtiges Thema dar. Für den Einzelnen steht die lebensbedrohliche Situation mit möglichen Langzeitfolgen im Vordergrund. Dazu kommen Schmerzen, Funktionseinschränkungen oder Verlust des Arbeitsplatzes. Im Gesundheitswesen stellen die permanent abrufbereiten und verfügbaren Ressourcen ein Problem dar, denn zur Versorgung von Schwerstverletzten werden durchgehend Mittel im personellen wie auch im strukturellen Bereich (Traumazentren) benötigt (37). Ein interdisziplinäres Behandlungsteam, welches bei Eintreffen des Patienten bereitsteht, ist einer der wichtigen Voraussetzungen für die erfolgreiche Behandlung Schwerstverletzter (30). Teil dieses Teams sind Unfallchirurgen und Anästhesisten, welche bei Bedarf von Konsiliarärzten wie Neurochirurgen, Kieferchirurgen oder Gefäßchirurgen ergänzt werden können (37). Aber auch die Blutbank, das Labor und die Röntgendiagnostik müssen rund um die Uhr kurzfristig bereitstehen. Zudem werden freigehaltene Notfalloperationssäle und Intensivbetten benötigt, die für die sofortige, maximale und simultane Behandlung polytraumatisierter Patienten unabdingbar sind (31). Lefering et al. fragten sich im Jahre 2017, ab wann eine Person als „schwer“ verletzt gilt und wie dieses klassifiziert wird. Es gibt ein Kontinuum von leichten über mittlere bis hin zu schweren und schwersten Verletzungen, da die Entität nicht klar umschrieben ist (37). Sind hierbei Letalität, Langzeitfolgen oder Schwere einer Verletzung Kriterien dafür, dass eine Verletzung „schwerer“ als die andere ist? (37, 38). Dieser Frage gehen Jahre unterschiedlicher Klassifikationen und Definitionen voraus. Grund hierfür ist, dass sich die Bestimmung einer allgemeingültigen Definition deutlich schwieriger darstellt als bei Krankheitsbildern wie einem Herz-Kreislauf-Stillstand oder einem Schlaganfall (37). Der Schweregrad eines Polytraumas ist initial nicht unbedingt an der Summe der Einzelverletzungen oder an hämodynamischen Parametern festzumachen. Die Entwicklung dieser Messsysteme ist aufgrund von Anforderungen wie Objektivität, Aussagekraft, Validität und Praktikabilität schwierig und langwierig (39). Alle Bewertungssysteme haben gemeinsam, dass sie einen gefährdeten Patienten (Sensitivität) möglichst identifizieren, dabei aber die Verletzungsschwere geringgradig Verletzter nicht überbewerten sollen. Der Begriff des Polytraumas ist weit verbreitet. Seit 1985 gilt die von Tscherne entwickelte und etablierte Definition, dass ein Patient multiple Verletzungen, von denen eine oder ihre Kombination lebensbedrohlich ist, aufweist (13) (s. Kapitel 2.1.1 *Definition des Polytraumas*). Etabliert ist diese Definition auch deshalb, da sie sehr eingängig und klinisch gut anwendbar ist. Für wissenschaftliche Auswertungen oder Register reicht diese Definition aber häufig nicht aus (37, 38). Daher finden sich in der Literatur sehr viele unterschiedliche Definitionen eines „Schwerstverletzten“. Tabelle 1 gibt hierzu einen ersten Überblick.

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Definitionen für schwerverletzte Unfallopfer

Bezeichnung	Definition	Anerkennung
(Amtlich) schwer verletzt	Mindestens 24h im Krankenhaus	Straßenverkehrsunfallstatistik
Ernsthaft schwer verletzt	MAIS3+	Entspricht der Definition von „serious injuries“ auf europäischer Ebene
Schwerverletzt	ISS \geq 16	In der internationalen Literatur weit verbreitet; schließt auch schwere isolierte Verletzungen mit ein
Polytrauma (Tscherne) (13)	Multiple Verletzungen, von denen eine oder mehrere lebensgefährlich sind	In Deutschland weit verbreitet, pragmatisch und handlich, aber ohne scharfe Kriterien
Polytrauma (Berlin) (40)	AIS \geq 3 in mindestens zwei Körperregionen plus physiologische Probleme	Internationaler Konsensprozess, Erweiterung um die Komponente der Physiologie
Lebensgefährlich verletzt	ISS \geq 16 plus physiologische Probleme	Schließt auch schwere isolierte Verletzungen mit ein
Baiskollektiv (16)	MAIS3+ oder Intensivtherapie oder verstorben (aber ohne MAIS 1)	Eigentlich keine Schweregraddefinition, sondern dient als Grundlage der Berichterstattung im TraumaRegister DGU®

übernommen von Lefering (37). DGU Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie, MAIS Maximaler Abbreviated Injury Scale Schweregrad, ISS Injury Severity Score.

Beispielsweise fällt unter einen „Schwerverletzten“ in der Definition der amtlichen Verkehrsunfallstatistik eine Person, die sich nach einem Unfall für mindestens 24 h in einem Krankenhaus aufgehalten hat (37, 41). Als „leicht“ verletzt zählen diejenigen, die gar nicht oder nur ambulant für wenige Stunden in einer Klinik behandelt worden sind. Diese Einteilung wird vor Ort durch die Polizei vorgenommen. Eine Validierung dieser Einteilung oder eine Verknüpfung mit den im Krankenhaus erhobenen Daten erfolgt aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht (42, 43).

2.3.1 Abbreviated Injury Scale (AIS)

Die Abbreviated Injury Scale (AIS) bildet die Grundlage vieler Klassifikationen. Die Entwicklung dieses Scores reicht bis in die frühen 1970er Jahre zurück (43). Seitdem wurde diese Klassifikation wiederholt überarbeitet und erweitert, 2015 wurde die letzte Revision veröffentlicht (44). Der AIS stellt heute ein Codebuch von über 2000 Verletzungen dar und orientiert sich an anatomischen Gesichtspunkten. Jeder siebenstelligen Code wird einer von sechs Körperregionen zugeordnet (45).

Tabelle 2: Schweregradklassifikation der Abbreviated Injury Scale

Schweregrad	Beschreibung	Beispiele
1	Leicht	Kleine Fleischwunden, Hämatome, Finger-/Zehenfrakturen, Fraktur einer Rippe, Contusio, Verletzungen von Bändern und Sehnen
2	Mäßig	Radiusfraktur, geschlossene Tibiafraktur, Leberkontusion, Wirbelkörperfraktur ohne Beteiligung des Rückenmarks, Subarachnoidalblutung (SAB)
3	Ernsthaft	Nierenverletzung (>1 cm tief); Femurfraktur; offene Tibiafraktur; Schädelbasisfraktur; Rippenserienfraktur
4	Schwer	Hämatothorax (>1000 ml), intrazerebrale Blutung mit Koma > 6 h, schwere Milzverletzung, Contusio spinalis
5	Kritisch	Instabile Open-book-Fraktur des Beckens mit relevantem Blutverlust (>20 % des Blutvolumens), intrazerebrales oder subdurales Hämatom >50 cm ³ , Verletzung des Rückenmarks
6	Maximal, zur Zeit nicht behandelbar	Hirnstammverletzung, hoher Querschnitt (C1–C3), Aortenabriss mit Blutung über das Mediastinum hinaus

übernommen von Lefering (37). DGU Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie, MAIS Maximaler Abbreviated Injury Scale Schweregrad, ISS Injury Severity Score.

2.3.2 Injury Severity Score

Als eines der weltweit häufigsten genutzten Punktsysteme zur Beschreibung von Schwerstverletzten kommt der Injury Severity Score (ISS) zum Einsatz (43). Daher wird auch in der akademischen Literatur der ISS häufig verwendet. Ein Schwerverletzter wird durch einen Punktwert von 16 oder mehr definiert. Wichtig zu erwähnen ist, dass ein ISS 16+ nicht mit einem Polytrauma gleichzusetzen ist, da auch schwere isolierte Verletzungen (ab AIS-Grad 4) zu einem ISS von 16+ Punkten führen. Zur Berechnung des ISS werden die Summe der Quadrate der AIS-Schweregrade in den drei am stärksten betroffenen Körperregionen benötigt (43). Der ISS wählt aus sechs Körperregionen (Kopf/Hals (mit Halswirbelsäule), Gesicht, Thorax, Abdomen, Extremitäten mit Becken und Schulter und Muskel- und Weichteilverletzungen) die drei am schwersten betroffenen aus (43). Der ISS ist trotz wiederholter Kritik international etabliert. Ein Kritikpunkt stellte dabei dar, dass mehrere Verletzungen derselben Körperregion nicht ausreichend abgebildet werden. Somit werden also nur Verletzungen aus unterschiedlichen Körperregionen betrachtet.

2.3.3 New ISS

Aus diesem Grund haben 1997 Osler et al. eine Modifikation des ISS auf den Weg gebracht, den New ISS oder NISS. Dieser betrachtet die drei schwersten Verletzungen unabhängig von ihrer Lokalisation, das Quadrieren und Zusammenzählen sind analog zum ISS (46). In

wissenschaftlichen Publikationen wird dem NISS daher ein Vorteil gegenüber dem ISS zugesprochen. Allerdings hat sich dieser international, gerade in der amerikanischen Literatur, noch nicht durchsetzen können (38).

2.3.4 Maximum AIS

Eine weitere Möglichkeit, die Verletzungsschwere zu beschreiben, stellt der Maximum AIS (MAIS) dar. Hierbei wird die schwerste Verletzung betrachtet. Vor 2013 gab es für die einheitliche Erfassung von Verkehrsunfallfolgen in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union (EU) keine einheitliche Definition für schwere Verletzungen im Straßenverkehr. Daraufhin hat die EU durch das European Transport Safety Council (ETSC) eine Definition von „serious road injuries“ (d.h. ernsthaften Verletzungen) auf den Weg gebracht. Somit hat die EU für eine objektive und zuverlässige Datenerhebung ein international vergleichbares Messinstrument eingeführt. Ein Verunfallter mit einem MAIS +3, also einer Verletzung ab einem AIS-Schweregrad von 3, gilt hier als ernsthaft verletzt (38, 47).

2.4 Pathophysiologie des Polytraumas

Im Rahmen eines Polytraumas unterteilt sich die posttraumatische Sterblichkeit in eine frühe (<48 h) und eine späte (> 48 h) Phase (48). Die frühe Mortalität wird durch schwere intrakranielle Verletzungen und traumatisch bedingte Koagulopathien beeinflusst (48, 49). Das Versterben in der späten Phase wird durch einen posttraumatischen inflammatorischen Prozess, dem *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS), Sepsis sowie Einzel- und Multiorganversagen (*engl. multi organ failure, MOF*) begründet (48). Das SIRS beschreibt ein generalisiertes Entzündungsgeschehen, welches durch pro-inflammatorische Zytokine und andere Entzündungsmediatoren ausgelöst wird (48). Bei einer experimentellen Studie am Polytraumamodell in der Maus zeigte sich nach experimentellem hämorrhagischen Schock und nach einer Kombination von PT mit hämorrhagischem Schock eine vermehrte systemische Entzündung (50, 51). Diese wurde durch eine höhere Serumkonzentration von Interleukin 6 nachgewiesen (*siehe Kapitel 2.4.5 Zerebrale Veränderungen nach SHT*) (50, 51). Parameter der humoralen Zellantwort der Immunreaktion spielen im klinischen Alltag – wenn auch noch kontrovers diskutiert – eine Rolle (49). Akute-Phase-Proteine wie das C-reaktive Protein (CRP), D-Dimere und das Prokalcitonin werden meist routinemäßig bestimmt (49). Aber auch Interleukine (v.a. IL-1, IL-6 und IL-10) werden mittlerweile bei spezifischeren Fragestellungen angefordert. Diese zeigen in der posttraumatischen sowie der postoperativen Phase zuverlässige Peaks, deren Höhe mit dem Auftreten von Organversagen korreliert (49, 52). Obwohl die pathophysiologischen Abläufe und deren Monitoring anhand von konkreten Laborparametern bekannt sind, spielen sie in der Entscheidungsfindung zur definitiven oder abgestuften Primärversorgung keine wesentliche Rolle (49, 53). Hier werden Punktesysteme zur Einordnung klinischer Beobachtungen sowie klassische Laborparameter herangezogen

(49, 53). Z.B. fallen Gerinnungsstörungen im Labor durch eine massive Steigerung der Konzentration von Fibrinolyseprodukten und D-Dimeren auf (54). Als Therapie kommt die Heparin-Gabe sowie eine Substitution von Gerinnungsfaktoren und Antithrombin-III in Betracht (51). Aufgrund der Fragestellung dieser Dissertation werden das Schädelhirntrauma und die Femurfraktur (v.a. deren pathophysiologischen Einflussnahme auf den sekundären Hirnschaden) als zwei der häufigsten Verletzungsmuster des Polytraumas im Folgenden genauer erörtert.

Das Schädelhirntrauma

2.4.1 Definition des Schädelhirntraumas

Das Schädelhirntrauma (SHT) tritt oft im Zusammenhang mit einem Polytrauma auf. Es beschreibt jegliche Verletzung des Schädels (mit oder ohne Fraktur), die mit einer Schädigung des Gehirns einhergeht (55). In der Leitlinie des DGN aus dem Jahr 2015 wird ein SHT als eine Folge einer Gewalteinwirkung, die zu einer Funktionsstörung und/oder Verletzung des Gehirns geführt hat oder mit einer Prellung oder Verletzung der Kopfschwarte, des knöchernen Schädels, der Gefäße und/oder der Dura verbunden sein kann. Eine Verletzung des Kopfes ohne Hirnfunktionsstörung oder Verletzung des Gehirns bezeichnet man als Schädelprellung (56). SHT sollten nach einem Unfall gründlich untersucht werden, da auch geringe Verletzungen eine Hirnblutung oder -schwellung auslösen können und die Symptome manchmal erst nach einigen Tagen auftreten.

2.4.2 Klinische Einteilung und Klassifikation der posttraumatischen Bewusstseinsstörung

Die klinische Einteilung ist Basis aller Klassifikationen des SHT, welche durch weitere Untersuchungsmethoden sinnvoll ergänzt werden kann. Das initial wichtigste Symptom nach schwerer Schädel-Hirn-Verletzung ist die posttraumatische Bewusstseinsstörung. Tönnis beschrieb 1959 die verschiedenen Stadien der Bewusstlosigkeit nach SHT, wobei er drei verschiedene Stadien unterschied (57). Diese Unterscheidung reicht von Grad I mit Bewusstseinsstörung/Somnolenz bis Grad III, dem Koma. Loew entwickelte eine sich darauf aufbauende Einteilung der posttraumatischen Hirnschädigung, welche bis heute noch teilweise gebräuchlich ist.

Tabelle 3: Schweregrad des Schädelhirntraumas nach Tönnis und Loew 1953 (50)

Schweregrad	Dauer
Grad I	Rückbildung der Hirnfunktionsstörung innerhalb von 4 Tagen
Grad II	Rückbildung der Hirnfunktionsstörung innerhalb von 3 Wochen
Grad III	Persistieren der Störungen über 3 Wochen

Tabelle 3 beschreibt die 1953 von Tönnis und Loew gemeinsam entwickelte Einteilung der drei Schweregrade des SHT (58). Diese Einteilung beruht vor allem auf der Dauer der posttraumatischen Hirnfunktionsstörung. Teasdale und Jennett starteten 1974 die ersten Versuche, eine Hirnfunktionsstörung bei der ersten körperlichen Untersuchung abzuschätzen (59). Dabei entwickelten sie ein Punktesystem, welches den augenblicklichen neurologischen Befund erfasste, die sogenannte Glasgow Coma Scale (GCS). Das Augenöffnen, die verbale und die motorische Reaktion bilden drei Teilaspekte des Bewusstseins. Diesen wurden semiquantitative Werte zugeteilt. Nach der ersten Revision von Teasdale der GCS im Jahre 1976 wurden durch Summation der drei Teilergebnisse eine Punktzahl zwischen 3 und maximal 15 Punkten erzielt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Glasgow Coma Scale

Augenöffnung	Verbale Antwort	Motorische Antwort	Punkte
-	-	Aufforderung	6
-	Orientiert	Gezielt (Schmerz)	5
Spontan	Verwirrt	Ungezielt (Schmerz)	4
Aufforderung	Inadäquat	Beugekrämpfe	3
Schmerz	Unverständlich	Streckkrämpfe	2
Keine	Keine	Keine	1

Im Anschluss erfolgt die Schweregradeinteilung in leichtes (GCS 13 - 15), mittelschweres (GCS 9 - 12) und schweres SHT (GCS 3 - 8) (siehe Tabelle 5) (60, 61).

Tabelle 5: Einteilung der Schweregrade anhand der GCS

3 – 8 Punkte	Schweres SHT
9 – 12 Punkte	Mittelschweres SHT
13 – 15 Punkte	Leichtes SHT

Im Laufe der Zeit kristallisierten sich allerdings die Schwächen der GCS heraus, da sie nur von fraglicher prognostischer Bedeutung und zudem auch nur bedingt reproduzierbar ist (62). Ein weiterer Kritikpunkt ist, dass z.B. Hirnstammfunktionen nicht erfasst werden oder der Einfluss von Alkohol oder Sedativa unzureichend abgedeckt wird (63-65). Jedoch wird bis heute von der GCS in der Notfallversorgung und im klinischen Alltag Gebrauch gemacht, da die Klassifizierung neben dem akademisch-epidemiologischen Wert, auch eine grobe prognostische Relevanz und vor allen Einfluss auf unmittelbare Therapieentscheidungen, wie beispielsweise einer Schutzintubation hat.

2.4.3 Anatomisch-pathologische Klassifikation

Eine mögliche Klassifikation des SHT ist die Differenzierung in ein offenes und geschlossenes SHT, in Abhängigkeit des Zustandes der harten Hirnhaut (Dura mater). Ist die Dura mater intakt, liegt ein geschlossenes SHT vor. Ist diese hingegen eröffnet, d.h. es besteht eine Verbindung des Schädelinneren mit der Außenwelt, so liegt nach der oben genannten Einteilung ein offenes SHT vor (56).

2.4.4 Einteilung in primären und sekundären Hirnschaden

Bei einem Schädelhirntrauma erfolgt eine Differenzierung zwischen primärem und sekundärem Hirnschaden. Die pathophysiologischen Abläufe des Primärschadens, aber besonders des Sekundärschadens sind kompliziert und vielschichtig. Die folgenden Abläufe laufen parallel ab und beeinflussen sich gegenseitig.

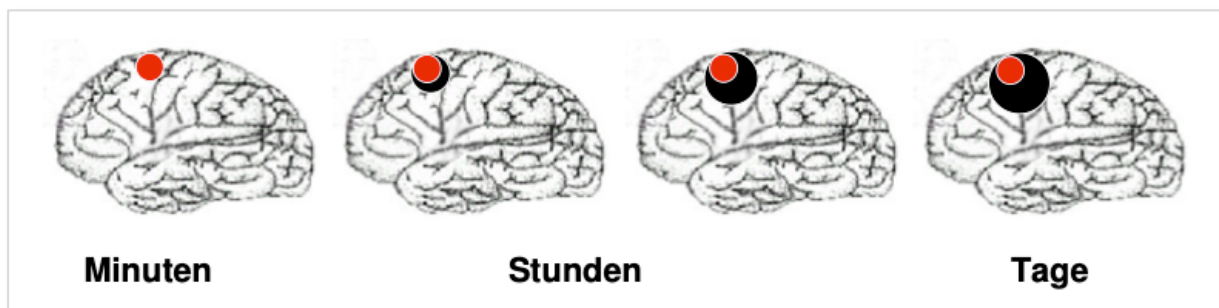


Abbildung 2: Schematische Darstellung des primären und sekundären Hirnschadens

Primärer Hirnschaden (roter Punkt), welcher sich in das umgebende gesunde Gewebe ausbreitet (sekundärer Schaden = schwarz). Modifiziert nach Dirnagl (66).

Primärer und sekundärer Hirnschaden

Der irreversible primäre Hirnschaden ist therapeutischen Ansätzen nicht zugänglich und kann nur durch Prophylaxe, wie exemplarisch durch Installation von Airbags oder dem Anlegen von Sicherheitsgurten unterbunden bzw. abgemildert werden (67). Dieser tritt als unmittelbare Folge einer Gewalteinwirkung auf das Gehirn innerhalb von Millisekunden (ms) auf. Dabei ist auch die Lokalisation des Schadens für die funktionellen Ausfälle durch den Primärschaden entscheidend. Neurone sind anfällig für abrupte mechanische Einflüsse, welches durch die viskoelastischen Eigenschaften der Axone begründet wird. Durch den mechanischen Schaden wird primär das Zytoskelett und somit sekundär der axoplasmatische Transport neuronaler Komponenten, wie z.B. Zellorganellen beschädigt. Neben dieser mechanischen Schädigung kann eine unkontrollierte Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat und zu einem vermehrten intrazellulären Calcium Einstrom führen, der eine Zerstörung von Mikrotubuli sowie eine Verdichtung von Neurofilamenten bewirken kann. Daraus folgt in den entsprechenden Schadensarealen eine axonale Akkumulation transportierter Proteine, welche zum Anschwellen der Axone führt und den Einstrom von Calcium möglicherweise weiter verstärkt

(68, 69). Weiterhin wird die intrazelluläre Aktivität Calcium-abhängiger Enzyme gesteigert, was letztlich zu einer Transektion der geschwollenen Axone führt (15, 70).

Die sekundären Prozesse, nach der mechanisch induzierten Zell- und Gewebeschädigung, sind eng miteinander verknüpft. Dabei spielt es eine wichtige Rolle, dass Hirnzellen die Zellen des menschlichen Körpers sind, die am sensitivsten auf einen Sauerstoffmangel reagieren. Durch das SHT kommt es zu vereinzelt oder mehreren minderdurchbluteten Arealen des Gehirnes, in denen die meisten Zellen beschädigt werden. Der Bereich, der die ersten nicht defekten Zellen umfasst, wird als Penumbra bezeichnet. Diese Zone weist ebenfalls einen hypoxischen Zustand auf. Allerdings ist bei diesen Zellen noch kein Zelltod eingetreten, d.h. hier ist eine Regeneration möglich. Der sekundäre Hirnschaden sorgt für eine Expansion der Destruktion über die Penumbra hinaus, also in zuvor unversehrtes neuronales Hirngewebe. Anschaulich wird dieser Prozess an vermeintlich leicht traumatisierten Patienten (GCS 13-15), die innerhalb von kürzester Zeit eintrüben und im weiteren Verlauf versterben (71). Der sekundäre Hirnschaden ist entscheidend für die Prognose des Patienten und ist einer therapeutischen Intervention zugänglich. Die aus dem Sekundärschaden resultierende intrakranielle Inflammationsreaktion kann zu einem verzögerten Hirnödem führen und ist daher ein entscheidender Einflussfaktor der Prognose. Der sekundäre Hirnschaden steht aus diesem Grund im Zentrum neuropathophysiologischer Forschungen (72).

Two Hit Theorie

Die Two-Hit Theorie spielt eine bedeutende Rolle beim pathophysiologischen Verständnis der posttraumatischen Inflammation (SIRS) und den kompensatorischen Gegenregulationen sowie deren Komplikation wie Sepsis und MOF (48). Das Polytrauma („first hit“) ist der Initiator einer Kaskade von Ereignissen. Dieses führt zur Zerstörung der zellulären Integrität der Gewebe und zu einer Aktivierung immunologischer Kaskaden (48). Im Laufe der akuten Reaktion reagiert der Körper mit einer metabolischen, neuroendokrinen, inflammatorischen und durch Hypovolämie getriggerten Reaktion auf das Polytrauma. Hierbei kann es – je nach Schwere des Traumas – zu einer Minderperfusion der Organe mit konsekutivem Missverhältnis von Sauerstoffangebot und -bedarf (Schock) kommen (73). Während des SIRS kommt es zu einem frühen Organversagen durch Katabolie, Akutphasereaktion und Reperfusionsschäden. Daraus resultiert ein autoaggressiver Circulus vitiosus mit Immundefektsyndrom und progressiver Koagulopathie. (74). Der septische Schock ist definiert als lebensbedrohliche Organfunktionsstörung bedingt durch eine dysregulierte Antwort des Patienten auf eine Infektion (51). Posttraumatisch entwickeln, laut Daten aus dem DGU Polytraumaregister, mehr als 6 % der PT-Patienten eine Sepsis, die in 20 % der Fälle zu einem Multiorganversagen führt (51). Unnötige Operationen oder Eingriffe zum falschen Zeitpunkt

erhöhen die Wahrscheinlichkeit eines „second hits“. Dabei kommt es durch einen Eingriff selbst, aber auch durch eine Hypothermie oder Hypotension, zu einer Verstärkung des

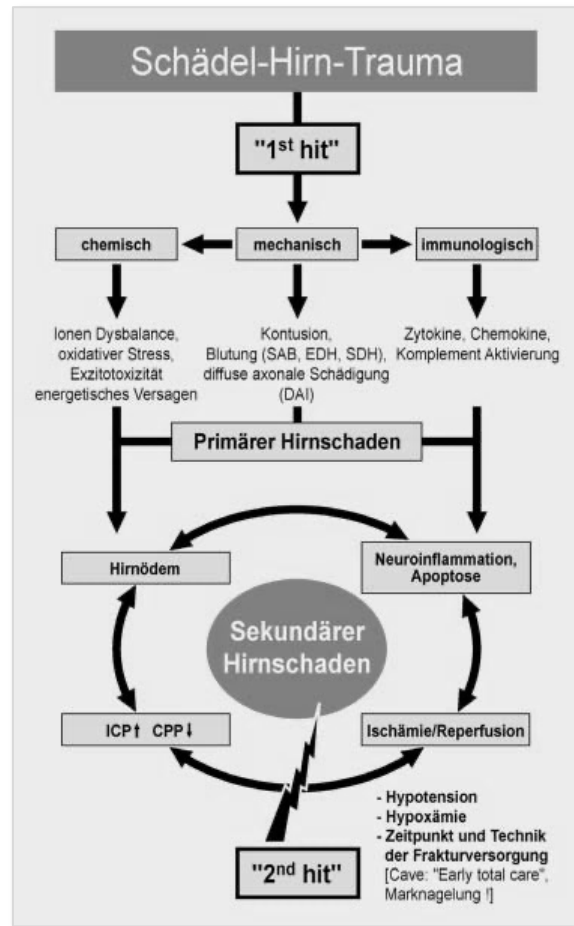


Abbildung 3: Pathophysiologie des SHT

Mechanismen der primären und sekundären Hirnschäden und Gefahr der Exazerbation des Sekundärschadens durch einen iatrogenen „2nd hit“ übernommen aus (75, 76).

SAB: Subarachnoidalblutung,

EDH: Epiduralhämatom,

SDH: Subduralhämatom,

DAI: „diffuse axonal injury“,

ICP: intrakranieller Druck („intracranial pressure“)

CPP: zerebraler Perfusionsdruck („cerebral perfusion pressure“)

Circulus vitiosus autoaggressivus (73). Zur Vermeidung dessen wurde eine Empfehlung zur definitiven Frakturversorgung am 5. - 10. Tag nach dem Trauma ausgesprochen (16, 75, 76). Aus traumatisch geschädigtem Gewebe werden vermehrt Gewebsthromboplastin und Kinasen freigesetzt, die zu einer verstärkten intravasalen Aktivierung der Gerinnung führen. So kommt es zu einer Entstehung von „Hyperkoagulabilität“ und disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC). Die Viskosität des Blutes steigt und die Mikrozirkulationsstörung wird verstärkt. Kommt es zu einer Diskrepanz zwischen dem Verbrauch und der Produktion von Gerinnungsfaktoren, folgt eine Verbrauchskoagulopathie mit anschließender hämorrhagischer Diathese und Ausfällung von Fibrin mit sekundären Organschäden. Im Rahmen des Schockgeschehens kann bei Nichterkennen ein irreversibler Schock resultieren (77).

2.4.5 Zerebrale Veränderungen nach SHT

Die pathophysiologische Kaskade des SHT

Der durch das Trauma ausgelöste Primärschaden führt zu einer direkten Zerstörung von Hirngewebe. Daraus resultiert eine Auflösung der Bluthirnschranke (BHS) und eine Dysregulation des zerebralen Blutflusses (*engl. cerebral blood flow, CBF*). Die sich anschließende Minderperfusion des Parenchyms erzeugt einen ischämieähnlichen Zustand, der über die folgende anaerobe Glykolyse zur Akkumulation von Laktat bzw. zu einer Laktatazidose führt (15). Die parallele Steigerung der Membranpermeabilität löst eine vermehrte Ödembildung aus. Der nun herrschende anaerobe Metabolismus bewirkt eine Entleerung des Adenosin-Triphosphat (ATP)-Depots, was in einem konsekutivem Versagen energieabhängiger Ionenpumpen endet (15). Eine Störung des Natrium-Kalium-Transmembranproteins (ATPase) sorgt für eine Fehlregulation des Konzentrationsgradienten bzw. des Ruhemembranpotentials. Dies löst eine Membrandepolarisation aus, die mit einer übermäßigen Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern Glutamat und Aspartat einhergeht – dem Vorgang der Exzitotoxizität (78-80). Der konsekutive Einstrom von Calcium und Natrium induziert eine intrazelluläre Aktivierung von Enzymen mit begleitender Dysregulation der Mitochondrien, Bildung freier Fettsäuren und Sauerstoffradikalen (15, 78). Es kommt zur Entstehung von strukturellen Veränderungen in den Zellmembranen und in der nukleosomalen Desoxyribonukleinsäure (*DNS, engl. Deoxyribonucleic acid, DNA*), die pathologisch sind und Nekrosen oder den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren (81).

Veränderungen der BHS und Hirnödem

Die Bluthirnschranke (BHS) weist einen dreischichtigen Aufbau auf, bestehend aus dem Endothel der Kapillaren, der Basalmembran sowie der von den Astrozyten ausgehenden Fortsätzen. Die physikalische Barriere der BHS wird durch die Ausbildung von Membranproteinen zwischen den Zellen gebildet und verhindert so eine parazelluläre Diffusion. Hierbei sorgen tight junctions sowie adherence junctions, als Bestandteile der verschließenden und haftenden Zellkontakte, für eine Trennung in unterschiedliche Kompartimente und kontrollieren so den Fluss von Nährstoffen, Ionen und Molekülen wie Toxinen durch den Zellzwischenraum. Die metabolischen Funktionen werden von enzymatischen Vorgängen innerhalb der Endothelzellen übernommen. Dadurch trägt die BHS zur Aufrechterhaltung der zerebralen Homöostase bei (82). Wird dieser Mechanismus gestört, resultiert daraus eine verminderte Integrität der Bluthirnschranke und ein vermehrter Einstrom von Zytokinen und Entzündungszellen ist möglich.

Veränderungen des intrakraniellen Drucks

Eine entscheidende Determinante für das Überleben und die neurologische Erholung des Patienten ist der intrakranielle Druck (*engl. Intracranial Pressure, ICP*) (83). Schon im 19. Jahrhundert beschrieb der schottische Anatom Monroe die Abhängigkeit des ICP vom intrakraniellen Volumen. In seiner Doktrin erläutert er, dass die Summe der drei Kompartimente Gehirnparenchym, Blut und Liquor innerhalb des Kraniums im Gleichgewicht stehen müssen, um den ICP konstant zu halten.

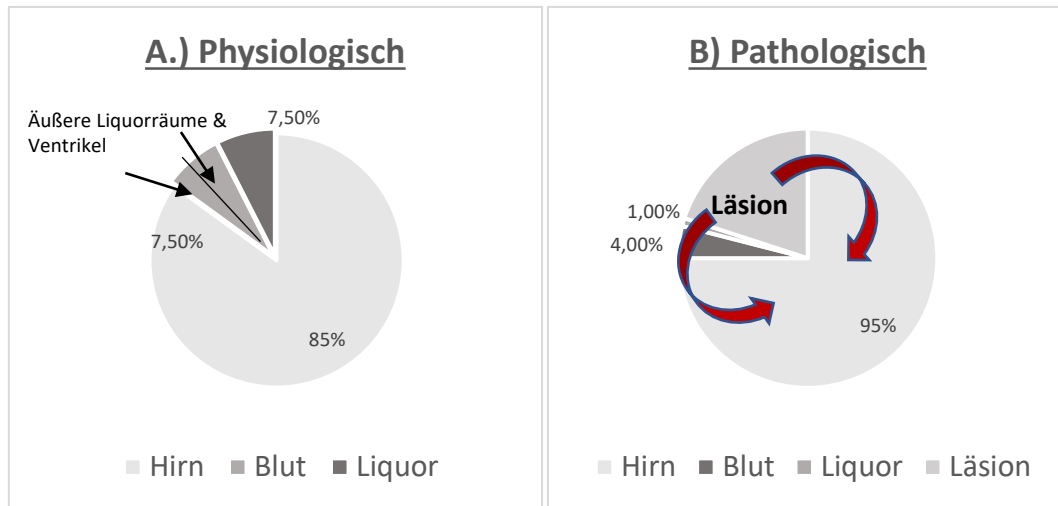


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Monroe-Kelli-Doktrin. Modifiziert nach (1,2)

A: Zusammensetzung des intrakraniellen Volumens aus den drei Komponenten Gehirn, Liquor und Blut.
 B: Zunahme an Hirnvolumen durch raumforderndes Ödem auf Kosten anderer Kompartimente.

Das Fassungsvermögen des Gehirnparenchyms beläuft sich auf ca. 1600 ml. Kommt es zu einem Anstieg in einem dieser Kompartimente, so kann der Druck durch die Reduzierung in einem der anderen Kompartimente ausgeglichen werden. Z.B. kann dies durch Umverteilung von Liquor oder Blut nach extrakranial erfolgen. Dieser Mechanismus funktioniert bis zu einem gewissen Grad der Veränderung des intrakraniellen Volumens. Wird diese Grenze überschritten, resultiert daraus ein Zusammenbrechen des Systems, welches zu einem steilen Anstieg des ICP führt (84). Kommt es als Folge eines SHT zu einem intrakraniellen Hämatom, Hirnödem oder zu einer Liquorabflussstörung, lässt sich meist ein messbarer Anstieg des ICP und ein Abfall des CPP verzeichnen.

Veränderungen der zerebralen Perfusion

Die Versorgung des Gehirns mit Blut pro Zeiteinheit wird über den CBF definiert. Einen entscheidenden Anteil der Versorgung des Gehirns bildet der Circulus arteriosus Willisii, der durch die beiden Arteriae carotides internae und den beiden Arteriae vertebrales gebildet wird. Für die physiologische Perfusion des Gehirns werden etwa 15 % des Herzzeitvolumens benötigt, wobei die graue Substanz 80 - 140 Millilitern pro Minute (ml / min) pro 100 Gramm (g) Hirngewebe und die weiße Substanz 24 ml/min benötigt (85, 86). Je nach Bedarf kann die

zerebrale Durchblutung durch autoregulatorische Mechanismen bei einem mittleren arteriellen Druck (*engl. mean arterial pressure*, MAP) von 60 - 150 Millilitern Quecksilbersäule (mmHg) moduliert werden. Der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) und der zerebrale Gefäßwiderstand (*engl. cerebrovascular resistance*, CVR) beeinflussen den CBF maßgeblich. Dieser lässt sich anhand des Quotienten aus CPP und CVR ermitteln. Für eine konstante Perfusion gehen Änderung des CPP mit Anpassungen des CVR einher. Die Differenz von MAP und ICP ergeben den CPP wie in dargestellt:

$$\text{CPP} = \text{MAP} - \text{ICP}$$

mit $\text{MAP} = P_{\text{dia}} + 1/3 (P_{\text{sys}} - P_{\text{dia}})$

Abbildung 5: Berechnung des zerebralen Perfusionsdruckes (CPP).

In Folge eines SHT kommt es ab einem CBF von weniger als 20 ml / min / 100 g Hirngewebe zu einer reversiblen, ab 15 ml / min / 100 g Hirngewebe tritt eine irreversible Funktionseinschränkung mit Gewebeuntergang auf (86, 87). Die Perfusion kann durch unterschiedliche Faktoren gestört sein. Zum einen wirken sich mechanische Verletzungen von Gewebe oder Gefäßen negativ auf den CBF aus (88). Zum anderen kann es zu Störungen des autoregulatorischen Mechanismus, zu endothelialer Dysfunktion oder thromboembolischen Ereignissen kommen.

Inflammatorische Reaktion

Der elementare pathophysiologische Prozess für die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach SHT ist die überschießende intrakranielle Entzündungsreaktion (89, 90). Bis vor einigen Jahrzehnten war die Hypothese eines „immunprivilegierten“ zentralen Nervensystems (ZNS) noch allgegenwärtig (75, 91-97). Diese besagte, dass das ZNS durch eine physiologische Barriere, gebildet durch die BHS und das fehlende lymphatische System, eine strikte Abschottung von peripheren zirkulierenden Immunzellen erfuhr. Heutzutage gilt es als erwiesen, dass v.a. Gliazellen im ZNS selbst als immunkompetenter Zellen dienen und das Gehirn zugänglich für periphere Immunzellen ist (98). Gliazellen können alle Mediatoren des angeborenen Immunsystems synthetisieren und deren Rezeptoren exprimieren (75, 92, 93, 95, 97, 99). Das Gehirngewebe reagiert mittels neuropathologischer Reaktion, der sogenannten Gliose, in kürzester Zeit durch die Aktivierung des Komplementsystems auf eine Schädigung des Gehirns (traumatische oder toxische Verletzung). Entscheidende endogene Mediatoren der neuroinflammatorischen Reaktion nach SHT sind sauerstoff- und stickstoffvermittelte Radikale, Zytokine, Chemokine und Komplement-Anaphylatoxine (75, 100-105). Im weiteren Verlauf führen diese Mediatoren zur direkten Schädigung des bereits verletzten Gehirns oder sie führen indirekt über eine intrakranielle Rekrutierung peripherer Zellen zur lokalen Freisetzung toxischer Enzyme und Metaboliten (75). Dies führt zu einer Aufrechterhaltung und weiteren Exazerbation der lokalen Entzündungsreaktion im Gehirn (75,

96, 106-108). Jedes schwere „periphere“ Trauma beeinflusst die Integrität der Bluthirnschranke, da zwischen dem intrakraniellen und dem systemischen System eine bidirektionale Kommunikation der Mediatoren herrscht. Es kommt zur Ausbildung einer systemischen Entzündungsreaktion, unabhängig davon, ob ein SHT vorliegt oder nicht (108, 109).

Gliazellen

Das Gehirn eines gesunden Erwachsenen enthält etwa 86 Milliarden Neuronen, wovon die Hälfte auf Gliazellen fällt (110-112). Diese lassen sich auf drei großen Gruppen aufteilen: Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia, die alle unterschiedlichen Aufgaben nachgehen (112).

Mikroglia übernehmen wichtige Aufgaben der Immunantwort. Sie gehören dem angeborenen, ZNS eigenen Immunabwehrsystem an, welches Teil der zellulären Immunantwort ist. Im gesunden Gehirn befinden sie sich in einem Art Ruhezustand, in dem sie stets in Bewegung sind und dabei überwachende Aufgaben wahrnehmen. Bei Beschädigung des Nervensystems werden sie durch freigesetzte intrazelluläre Bestandteile, sogenannten DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) aktiviert (113-115). Im aktivierten Zustand migrieren die Mikroglia zum Schadensort und übernehmen die Funktion von Makrophagen. Dabei phagozytieren sie anfallende zelluläre und toxische Bestandteile oder sezernieren neuroprotektive Faktoren (z.B. Transforming Growth Factor beta, TGF β oder Interleukin 10, IL-10) (116). Die Schwere des Traumas findet sich direkt in der proportionalen Aktivität der Mikrogliazellen wieder (117, 118). In der Literatur wird die Wirkung von Mikrogliazellen auf die Entzündungsreaktion kontrovers diskutiert. Zum einem wird diesen eine neuroprotektive Funktion zugesprochen, andere sprechen Mikrogliazellen durch eine überschießende Reaktion einen schädlichen Einfluss zu. Diese Effekte sind abhängig vom Phänotyp der Mikroglia. Hierbei werden zwei Zustandsformen unterschieden: der proinflammatorische M1- sowie der immunsuppressive M2-Phänotyp (119). Primär überwiegt der M1-Phänotyp, welcher Phänotyp der Mikroglia gerade vorherrscht ist jedoch abhängig vom Krankheitsstadium sowie dem Schweregrad der Erkrankung (119). Der schädliche, langanhaltender Einfluss von Mikrogliazellen soll nicht nur chronische Neuroinflammation nach SHT bewirken, sondern auch durch demyelinisierende Prozesse eine entscheidende Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer spielen (110, 120-123). Zudem werden Mikroglia mit einer erhöhten Inzidenz von Morbus Alzheimer nach SHT in Zusammenhang gebracht (124).

Astrozyten sind miteinander verknüpft, gehen vielfältigen Aufgaben nach und bilden dabei innerhalb des ZNS ein riesiges Netzwerk (Syncytium). Allem voran ist die Beteiligung der Astrozyten an der BHS und deren Permeabilität klinisch bedeutsam, da es nach deren Verletzung oft zu neuroinflammatorischen Prozessen in betroffenen Hirnarealen kommt (123,

125). Astrozyten spielen im Rahmen der Aufnahme und Freisetzung bestimmter Neurotransmitter, z.B. Glutamat, eine wichtige Rolle (121, 126). Nach einer Verletzung wird die Aktivität der Astrozyten konsekutiv gesteigert. Dabei regt das aus geschädigten Zellen freigesetzte Calcium und ATP die Migration von Mikroglia und weiteren Astrozyten an (121, 127). Astrozyten werden im aktivierten Zustand als reaktive Astrozyten bezeichnet und schwellen dabei morphologisch an (128). Im Rahmen der induzierten Astrogliose begünstigen sie die Neuroprotektion, indem sie durch die Wiederaufnahme von Glutamat zu einer verringerter Exzitotoxizität führen (127, 129, 130). Mittels Freisetzung von Antioxidantien, welche freie Sauerstoffradikale (ROS) binden können, resultiert eine Reduktion des Schadens. Dabei werden diese durch phagozytotisch aktive Mikrogliazellen beim Beseitigen von Zellschrott unterstützt (127, 129, 130). Im Rahmen einer Verletzung des ZNS spielen Astrozyten bei der Ausbildung der gliären Vernarbung (*glial scar*) am Läsionsrand eine Rolle, welche den Schaden zum Hirngewebe abgrenzt und so das Ausbreiten der inflammatorischen Vorgänge verhindert (121, 123, 127, 131). Astrozyten bewirken zudem eine Hochregulation der Expression von Intermediärfilamenten, wie dem *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP), welches eine Rolle bei der Bildung der BHS sowie bei der Aufrechterhaltung des Zytoskeletts von Astrozyten spielen soll (132). Die Verletzungsmuster und -schwere, das Milieu und die Lokalisation sind Faktoren, von denen die astrozytäre Antwort abhängig ist (127, 133). Die neurotoxische Wirkung der Astrozyten soll durch Mikrogliazellen induziert werden. Dabei wird die Bildung der neurotoxischen Untergruppe - die Typ A1-Astrozyten - durch Il-1a, TNF und C1q sezernierende, aktivierte Mikrogliazellen ausgelöst (134). A1 Astrozyten sind nicht in der Lage das neuronale Überleben und Wachstum aufrecht zu halten, inhibieren Synaptogenese und weisen eine geringe Phagozytoseaktivität auf. Dadurch nehmen A1 Astrozyten eine neurotoxische Rolle während der Entstehung von Krankheiten wie Alzheimer, Huntington, Parkinson sowie multipler Sklerose ein (134, 135). Allerdings wird die neuroprotektive und neurotoxische Rolle von Astrozyten in Studien kontrovers diskutiert und bislang ist es in der Literatur noch zu keiner einheitlichen Charakterisierung gekommen (18, 19, 119, 136).

Zytokine

Zytokine gehören zu einer inhomogenen Gruppe von regulatorischen Proteinen, die der Signalübertragung zwischen Zellen dienen und ihre Proliferation und Differenzierung steuern (137). Zytokine wirken über Zytokinrezeptoren, über welche die extrazellulären Signale in die Zellen übertragen werden und wodurch sie an der Regulation zellulärer Prozesse beteiligt wie z.B. den Zellzyklus, die Proliferation und die Freisetzung von Immunmediatoren als auch Zytokine im Sinne eines positiven Feedback-Loops (138). Innerhalb der Zytokine lassen sich die Substanzgruppe der Zytokine des Immunsystems (Interleukine, Interferone, Chemokine, TNF- Superfamilie) sowie die Zytokine als Wachstumsfaktoren unterscheiden. Zudem lassen

sich pro-inflammatorische von anti-inflammatorischen Mediatoren differenzieren. Als Überblick der relevanten Zytokine dient Tabelle 6, auf einzelne wird im Folgenden näher eingegangen.

Tabelle 6: Überblick der verschiedenen Zytokine mit Entstehungsort und Funktion (136, 137)

Gruppe	Zytokin	Entstehungsort	Effekte
Interleukine	IL-1 β	Makrophagen, Monozyten, Endothelzellen	proinflammatorisch, stimuliert Bildung proinflammatorischer Zytokine, Aktivierung von T-Lymphozyten
	IL-6	Makrophagen, Monozyten, Endothelzellen	proinflammatorisch, Stimulation T- & B- Lymphozyten
	IL-8	Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen, Fibroblasten	proinflammatorisch, Chemotaxis: Anlockung von Neutrophilen und Stimulation zur Degranulation
	IL-10	Makrophagen, B - Lymphozyten	Antiinflammatorisch, inhibiert aktivierte Makrophagen, Hemmung von T-Zell Proliferation, Hemmung der Synthese anderer Zytokine
TNF - Superfamilie	TNF- α	Makrophagen, Monozyten, T-Lymphozyten	proinflammatorisch, Aktivierung von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen \rightarrow erleichterte Leukozytenmigration durch Steigerung der Gefäßpermeabilität
Wachstumsfaktoren	NGF		Fördert Wachstum und Differenzierung von Nervenzellen, Wachstum von Axonen in Richtung der Sekretionsquelle, Regulation der Neuropeptide, Apoptosehemmung
	IGF1		Fördert Zellteilung
	PGRN	Neurone, Mikroglia	Antiinflammatorisch wirksam, neurotrophe Wirkung in ZNS, wirkt positiv auf Überleben von Neuronen, Stimuliert Produktion IL-10

Interleukine werden nach ihrer Funktion benannt (von lat. Inter = „zwischen“ und griech. Leukos = „weiß“) - d.h., sie sorgen für die Kommunikation zwischen den weißen Blutzellen (Leukozyten). Es handelt sich um eine sehr große Gruppe von heterogenen Mediatoren mit bislang 15 identifizierten Subtypen. *Interleukin 1 beta* (IL-1 β) initiiert eine Entzündungsreaktion über die Bildung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine (IL-6). IL-1 β lotst weitere immunkompetente Zellen an den Schadensort und induziert die Ödembildung und den neuronalen Zelltod (139, 140). Die Produktion von IL-1 β sowie Tumornekrosefaktor alpha (s.u.) werden durch ROS (reactive oxygen species) induziert. Somit sorgen Antioxidantien für eine Regression der IL-1 β und des TNF α Spiegel (139). *Interleukin 6* (IL-6) beeinflusst durch Bindung an seine membrangebundenen Rezeptoren den oxidativen Stress, das neuronale Zellüberleben und die Wundheilung, wirkt sich also positiv auf den Regenerationsprozess aus (140, 141). Allerdings zeigt IL-6 eine ambivalente Wirkung. Es initiiert zum einen mit IL-1 zusammen eine Entzündungsreaktion, zum anderen werden die neurotoxischen Wirkungen

durch die Bindung von IL-6 an lösliche IL6-Rezeptoren ausgelöst, welches zur Induktion sog. trans-signalling Prozesse (pro-inflammatorische Vorgänge) führt (141-143). Die TNF-Superfamilie besteht aus Proteinen, die ihre Signale über den TNF-Rezeptor vermitteln. Diese Signale dienen regulatorischen Funktionen, z.B. Überleben/Absterben von Zelle und der Immunantwort. Der *Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- α)* ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches eine Entzündungsreaktion initiieren kann. Hierfür erfolgt eine Aktivierung von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen. Zudem sorgt TNF- α , wie IL-1 β , für eine Chemotaxis weiterer Immunzellen (139, 140). Zu den Zytokinen als Wachstumsfaktoren gehören der Nerve Growth Factor (NGF), der das Wachstum und die Differenzierung von Nervenzellen fördert. Zudem reguliert dieser Neuropeptide und hemmt den programmierten Zelltod (Apoptose, s.u.). Der *Insulin-like Growth Factor (IGF-1)* gehört ebenfalls zu den Wachstumsfaktoren und wird zum Teil von Astrozyten sezerniert und wirkt sich fördernd auf die Zellteilung aus. Es reduziert nach SHT das Ausmaß von Zelltod sowie motorische und kognitive Defizite (129). Dem NGF und dem IGF-1 werden neurotrophische Eigenschaften zugesprochen, d.h. diese sorgen für das Verringern neuronaler und glialer Apoptose und für eine verbesserte funktionelle Regeneration (139). Ein weiterer Wachstumsfaktor ist das *Progranulin (PGRN)*, welches von Neuronen und Mikroglia synthetisiert (144-147) und von Astrozyten (148) aufgenommen wird. PGRN entfaltet seine Wirkung als autokriner Wachstumsfaktor sowie als anti-inflammatorisch wirksames glykolisiertes Protein (149-151). Die anti-inflammatorische Wirkung kommt durch die kompetitive Bindung von PGRN an den TNF-Rezeptor zustande, welches die Interaktion zwischen TNF- α und dem TNF-Rezeptor stört (152). Somit inhibiert es die Interaktion dieses proinflammatorischen Zytokins mit seinem zugehörigen Rezeptor (152). Zudem induziert PGRN die Bildung von IL-10 in Mikrogliazellen (144), die ebenfalls eine anti-inflammatorische Wirkung entfalten. Nach einem Schadensereignis wurde die vermehrte Freisetzung von PGRN beobachtet, welche durch eine Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten die Erholung des ZNS beeinflusst (144, 153, 154). Ein PGRN Mangel hingegen, wurde mit einer verstärkten Apoptose und zunehmenden neurologischen Ausfällen in Zusammenhang gebracht (155). Nach einem SHT lässt sich der reaktive Anstieg von Zytokinen beobachten. Dieses lässt sich vorwiegend in der intrathekalen Produktion im Hirnwasser (cerebrospinal fluid, CSF) sowie im Hirngewebe nachweisen (117), wobei man festgestellt hat, dass die inflammatorische Antwort proportional mit der SHT Schwere korreliert. Als Folge ergibt sich eine prognostische Tendenz, die sich mithilfe einzelner Interleukine (IL1 β , IL6, IL10) ableiten lässt (117, 156). Jedoch ist diese Vorgehensart noch nicht etabliert und ist von verschiedenen Faktoren wie der Traumaart, -lokalisierung und auch von geschlechtsspezifischen und genetischen Aspekten abhängig (117). Das Fazit aus bisherigen wissenschaftlichen Arbeiten ist, dass eine inflammatorische Aktivität nach einem SHT essenziell für Reparationsmechanismen zu sein scheint, jedoch eine langanhaltende entzündliche Reaktion zu bleibenden Schäden führt (117, 140).

Zelltod

Es werden zwei Arten des Zelltods unterschieden. Beim sog. nekrotischen Zelltod kommt es durch die initiale mechanische oder ischämische Schädigung beim vorangegangenen SHT zur Zunahme des Zell- und Organellenvolumens (*Oncosis*). Es resultiert eine Plasmamembranruptur und der konsekutiv folgende Verlust intrazellulärer Bestandteile (157). Im weiteren Verlauf schließen sich die Beseitigung des Zelldetritus und die Bildung von Narbengewebe an, welche von einem inflammatorischen Prozess begleitet wird. Der programmierte Zelltod (Apoptose) hingegen beginnt verzögert, erst Stunden und Tage nach Eintreten der primären Schädigung beginnt der sogenannte nekrotische Zelltod. Dieser Prozess ist energieabhängig und morphologisch durch Zellschrumpfung bei intakter Zellstruktur gekennzeichnet. Hierbei kommt es zu einem Ungleichgewicht pro- und antiapoptischer Enzyme. Dabei lassen sich zwei Aktivierungswege, der intrinsische und extrinsische, differenzieren. Ersterer ist ein Caspasen-abhängiger Zelltod und wird durch die mitochondriale Schädigung (u.a. Calciumüberladung) induziert. Es folgt der Austritt von apoptotic protease activating factor und Cytochrom C, welches zur Ausbildung von Komplexen mit anderen Proteinen und Caspasen (v.a. Caspase 9), sog. Apoptosomen führt. Dem schließt sich eine weitere Rekrutierung von Effektor-Caspasen (v. a. Caspase 3 und 7) an (158). Die Bindung des Fas-Liganden an den passenden Fas-Rezeptor, einen TNF-Rezeptor, zur Bildung eines Multiproteinkomplexes gehört zum extrinsischen Weg. Es kommt zur Überlagerung der beiden Wege, via Caspase-8 vermittelter Spaltung, und endet in einer gemeinsamen Endstrecke ab Aktivierung der Effektor-Caspasen (158). Oxidativer Stress und die Sekretion von Apoptose-induzierender Faktoren führen zu einer Änderung des mitochondrialen Membranpotentials, unabhängig vom Proteasen-induzierten Weg. Dieser führt zu einem systematischen DNA-Schaden, einer Chromatinkondensation und dem Untergang der nukleären Strukturen, welche in Bildung von apoptotischen Körperchen endet. Diese werden von Mikroglia und anderen Makrophagen phagozytiert (81).

2.4.6 Periphere Veränderungen nach SHT

Nach einem experimentellen Schädelhirntrauma spielt die Neuroinflammation eine kurzfristige als auch eine langfristige Hauptrolle (132). Das CCI löst ein breites Spektrum an zellulären und molekularen Pfaden aus. Diese umfassen die Aktivierung von Gliazellen, v.a. Astrozyten und Mikroglia, die intrakranielle Produktion von inflammatorischen Markern als auch die Rekrutierung peripherer Immunzellen, welche durch eine gestörte BHS ungehindert in das Gehirn einströmen können (132). V.a. die Einwanderung von Leukozyten sowie die Hochregulation und Sekretion von Zytokinen und chemotaktischen Zytokinen (Chemokine) scheinen eine große Rolle in der Pathologie nach einem Schädelhirntrauma zu spielen (132, 159). Eine Studie aus dem Jahr 2018 untersuchte die peripheren Folgen nach einem CCI zu verschiedenen Zeitpunkten (1,3,7,14 und 60 Tagen nach Trauma) (160). Dafür wurde den

Versuchstieren Knochenmark, Blut, Thymus und Milz entnommen. In diesen organischen Materialien wurden Veränderungen der Immuzusammensetzung, die Produktion von ROS, die Zytokinproduktion sowie die phagozytotische Aktivität untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie ergaben eine sich dem Trauma direkt anschließende Knochenmarkaktivierung sowie eine Neutrophilie (160). Neutrophile und Monozyten zeigten Anzeichen von oxidativem Burst, welches eine Freisetzung von aggressiv-lytischen Sauerstoffradikalen bedeutet (161). Zudem wurde im Knochenmark eine chronische Erhöhung der ROS-Spiegel sowie der proinflammatorischen Zytokinproduktion 60 Tage nach Trauma festgestellt. Es konnte eine Thymusatrophie beobachtet werden, die mit einem chronischen Defekt in der Selektion und Reifung von T-Zellen gekennzeichnet ist. Außerdem wurde eine akute Splenomegalie und erhöhte Zahl an myleoiden Zellen beobachtet, welches für eine systemische Reaktion auf das CCI spricht. Folglich konnte eine systemische Supprimierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort nach einem CCI Trauma festgestellt werden (160).

Femurfraktur

2.4.7 Definition der Femurfraktur

Unter einer Fraktur versteht man die Zusammenhangstrennung des Knochens durch direkte oder indirekte Gewalteinwirkung, die die Elastizitätsgrenze des Knochens überschreitet (162). Die Frakturausprägung ist somit von externen Faktoren wie Art und Richtung der einwirkenden Gewalt und von internen Faktoren, nämlich der Knochenqualität (Osteoporose) abhängig. Dabei geht eine Fraktur immer mit einem Weichteilschaden einher (162).

2.4.8 Morphologie des Knochens

Anhand der Form lassen sich Knochen in lange, kurze und platte Knochen abgrenzen. Dabei werden drei Bereiche unterschieden: die längliche, schaftförmige Diaphyse, die beiden Knochenenden (die Epiphyse) und die zwischen Diaphyse und Epiphyse gelegene Metaphyse (163).

2.4.9 Histologie des Knochens

Histologisch erfolgt die Einteilung von Knochen in eine äußere Substantia compacta (Kompakta) die aus kortikalem Knochen besteht, sowie in eine inneren Substantia spongiosa (Spongiosa), die sich aus trabekulärem Knochen aufbaut (163). Beim Menschen umfasst die dicht gebaute Kompakta (Kortikalis) Osteonen, die das Harvers-System formen. Dieses besteht aus etwa 250 µm x 1 - 5 cm großen funktionellen Einheiten, die wiederum aus 2 - 3 µm dicken Knochenlamellen (Havers-Lamellen oder Speziallamellen) bestehen, die sich konzentrisch um den Zentralkanal (Havers Kanal) winden (163). Im Zentralkanal laufen Blutgefäße (Havers-Gefäße) die über seitliche Verzweigungen (Volkmann-Kanäle) miteinander verbunden sind, zudem finden sich im Zentralkanal Bindegewebe und vegetative Nerven (163). Im Gegensatz zum Menschen weist die Maus eine recht primitive

Knochenstruktur ohne Havers-System auf. Nach einer Knochenverletzung erfolgt der Knochenumbau über so genannte Resorptionshöhlen, welche in der Nähe der Fraktur entstehen und im Prozess der Frakturheilung mit Osteoblasten aufgefüllt werden (164). Das Knochenmark ist in den Zwischenräumen der Spongiosa zu finden, welches aus einem komplexen System aus Knochenbälkchen und -platten aufgebaut ist (163). Beim Knochengewebe lassen sich zwei verschiedene Arten unterscheiden: Geflecht- oder Faserknochen und Lamellenknochen. Kommt es zu einer Knochenneubildung, entstehen zunächst Geflechtknochen, die sich im weiteren Verlauf zu Lamellenknochen umwandeln können (163). Der Knochen enthält neben Osteozyten, des Weiteren mesenchymale Vorläuferzellen, Osteoblasten sowie Osteoklasten. Osteoblasten bilden neue Knochengrundsubstanz und können mittels alkalischer Phosphatase zur Mineralisierung des Knochens beitragen. Die Differenzierung der Osteoblasten nimmt nach Abschluss des physiologischen Knochenwachstums ab, wird aber im Rahmen der Frakturheilung wieder reaktiviert (165). Osteoklasten hingegen entstehen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen und sind mehrkernige Riesenzellen. Sie haben die Funktion, mineralisierte Knochengrundsubstanz abzubauen. Ein Osteoklast kann dieselbe Menge an Knochen abbauen, die 100-150 Osteoblasten gleichzeitig aufbauen (163). Die Knochengrundsubstanz (Interzellulärsubstanz) bildet sich zu 65 % aus anorganischen und zu 35 % aus organischen Bestandteilen. Knochenminerale wie Calciumphosphat und Calciumcarbonat bilden die anorganische Knochengrundsubstanz. Die organische Komponente wird aus 90 % Kollagen und 10 % nicht-kollagenen Proteinen und Lipiden gebildet (163). Der Knochen wird mit Ausnahme der knorpeligen Gelenkflächen von Periost überzogen.

2.4.10 Frakturzeichen

Es lassen sich sowohl sichere als auch unsichere klinische Frakturzeichen unterscheiden. Als sichere klinische Symptome gelten Deformität, Krepitation und abnorme Beweglichkeit. Zudem gehören sichtbare freie Knochenenden bzw. Fragmente (bei offener Fraktur) dazu. Als unsichere Zeichen zählt man hingegen Schmerz, Kompressionschmerz, Schwellung, Hämatom und Functio laesa (Funktionsstörung). Für die sichere Diagnose einer Fraktur ist eine Röntgenuntersuchung in zwei Ebenen unabdingbar. Hierbei werden auf die Vollständigkeit der Kortikalis, Aufhellungslinien, Stufenbildung oder Fragmentdislokationen geachtet (166).

2.4.11 Frakturheilung

Primäre Frakturheilung

Bei der primären (direkten) Frakturheilung kommt es zur Verbindung von Frakturfragmenten ohne Bildung einer äußeren Kallusmanschette. In Abhängigkeit vom Abstand der Frakturfragmente (beim Menschen größer oder kleiner als etwa 1 mm) unterscheidet man

Kontaktheilung und Spaltheilung. Im Rahmen der Kontaktheilung erfolgt die Knochenregeneration durch absolute Stabilität an den Stellen, an denen die Bruchflächen unmittelbaren Kontakt haben. Hierbei kommt es zu einem longitudinalen Wachstum über die Frakturlinie von Osteonen des einen Fragments in den angrenzenden Knochen des anderen Fragments und umgekehrt. Dabei entstehen durch den Abbau von Knochen durch Osteoklasten bohrlochähnliche Resorptionslakunen in Längsrichtung des Knochens. Osteoklasten bauen Knochen auf und füllen so die vorgeformten Kanäle wieder auf (167). Somit werden die Knochenbruchstücke auf direktem Weg miteinander vereinigt (168). An den Stellen im Frakturspalt, wo kein direkter Knochenkontakt besteht, kommt es innerhalb von 3 - 4 Wochen über einen Zwischenschritt zur Spaltheilung. Hierbei dringen Kapillare mit perivaskulärem Bindegewebe, vom Periost und Endost ausgehend, in den Frakturspalt ein. Aus dem eingedrungenen Bindegewebe differenzieren sich Geflechtknochen bildende Osteoblasten, dieser wird dann sekundär zu Lamellenknochen umgebaut (168). Bislang ist nicht bekannt, ob bei Mäusen ebenfalls eine primäre Knochenheilung stattfindet. Bislang angewandte Frakturmodelle an der Maus führen zur sekundären Frakturheilung (169, 170).

Sekundäre Frakturheilung

Unter der sekundären Frakturheilung versteht man das Zusammenwachsen des Knochens, wenn keine anatomische Reposition der Knochenfragmente erreicht werden kann. Diese gliedert sich in fünf, teilweise gleichzeitig ablaufende Phasen: Die Frakturphase umfasst die Zeit vom Einsetzen einer Gewalteinwirkung auf den Knochen und das umgebende Weichteilgewebe, bis die einwirkende Kraft durch den brechenden Knochen und das umliegende Gewebe aufgehoben wird (168). Dabei wird die Kortikalis, Spongiosa, Knochenmark, Periost und das angrenzende Weichteil verletzt und es kommt zur Ausbildung eines Hämatoms im Frakturbereich (168). Dem schließt sich eine 2 - 3 Tage anhaltende Entzündungsphase an, bei der es zu einer überschießenden Kapillaraussprossung und einer Kaskade der Proliferation, Migration und Differenzierung von überwiegend pluripotenten Stammzellen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen kommt. Dabei ist die Funktion der Mastzellen noch nicht eindeutig geklärt worden. Vermutet wird, dass sie eine Ausschüttung von Heparin und heparinähnlichen Substanzen bewirken und somit die lokale Vaskularisation und Zellmigration beeinflussen (168). Das mittlerweile von Fibrin und Kollagenfibrillen durchsetzte Hämatom wird durch Granulationsgewebe bestehend aus Lymphozyten, Fibroblasten, neu gebildetem Kollagen und zahlreichen Kapillaren ersetzt. Hierbei kommt es zur Ausbildung des sogenannten weichen Kallus, welches durch Granulationsgewebsbrücken zwischen den Knochenfragmenten geformt wird (Granulationsphase). Zeitgleich findet die Phagozytose abgestorbener Fragmente durch Osteoklasten statt. Es kommt zu einer Differenzierung von Chondroblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen. Subperiostal setzt eine direkte Knochenneubildung durch

Osteoblasten ein (desmale Ossifikation oder „primäre Kallusreaktion“) (168). Aus dem Markraum wandert zeitgleich ein so genanntes Blastern in das Frakturhämatom ein und füllt den Frakturspalt als medullärer Kallus aus. Beim Menschen sind nach etwa 3 - 4 Wochen die Fragmente durch Bindegewebe und Knorpel weich miteinander verbunden (168), bei der Maus wird dieses Stadium schon nach 10 - 14 Tagen erreicht (170). Es folgt die Phase der Kallushärtung. Dabei kommt es durch zunehmende Mineralisation der Grundsubstanz zum Aushärten des Kallus. Das hierfür benötigte Calcium kommt aus den Mitochondrien der hypertrophen Chondrozyten. Der entstehende Geflechtknochen (enchondrale Ossifikation) verläuft entlang neuer Kapillarsprossen. Zwischen der Diaphysenoberfläche und dem Periost (intramembranöse Ossifikation) erfolgt frakturspaltfern eine Osteoblastenproliferation und eine Ablagerung von Geflechtknochen (168). Das Modeling umfasst die Umwandlung des im Rahmen der Kallusbildung entstandenen Geflechtknochens in Lamellenknochen. Beim Remodeling wird die normale Knochenkontur sowie der ursprüngliche Markraum wiederhergestellt (168).

2.5 Traumaregister DGU®

Eine flächendeckende Generierung von Behandlungsdaten Schwerstverletzter auf nationaler Ebene hat lange Zeit nicht stattgefunden. Zur Beantwortung der Frage nach der Anzahl der schwerstverletzten Verkehrsunfallopfer, der Epidemiologie und den Langzeitfolgen dieses heterogenen Patientenkollektivs wurde 1993 ein Register von der Arbeitsgruppe „Polytrauma“ der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (Trauma Register DGU®) gegründet. Dieses Register diente fortan als Instrument zur multizentrischen Erfassung von Behandlungsdaten im deutschsprachigen Raum (171, 172). Dabei stand die Etablierung einer Datenbank zur wissenschaftlichen Evaluation der Traumaversorgung in Deutschland sowie die Schaffung einer Basis für interklinische Qualitätsvergleiche im Vordergrund. Den Anfang bildeten fünf Kernkliniken. Mittlerweile nehmen 689 Kliniken (Stand 2021) deutschlandweit an der flächendeckenden Erfassung der Patientendaten teil (56, 173, 174). Zudem wurde das Register um die Teilnahme aus dem europäischen Ausland erweitert (14, 174). Hierbei fließen beispielsweise Daten aus der Schweiz, Österreich oder den Niederlanden ein. Die vollständige Dokumentation aller Unfallpatienten erfolgt auf freiwilliger Basis, jedoch ist diese für dem TraumaNetzwerk DGU® (siehe unten) angehörige Kliniken zu Zwecken der Qualitätssicherung verpflichtend (173, 174). Jede teilnehmende Klinik erhält einen umfassenden, jährlichen Qualitätsbericht. Das Einschlusskriterium des Traumaregisters DGU® ist die Aufnahme des Patienten über den Schockraum mit einer sich anschließender Intensivtherapie. Außerdem werden Patienten eingeschlossen, die mit Vitalzeichen eingeliefert werden, aber vor Erreichen der Intensivstationen versterben (173, 174). Hingegen werden Patienten mit weniger schwerwiegenden Verletzungen ausgeschlossen. Der Schwerpunkt der Dokumentation liegt auf der präklinischen und frühen klinischen Versorgung. Die Daten werden zu vier

verschiedenen Zeitpunkten (Prälinik, Schockraum, Intensivstation und Entlassung) erhoben. Es werden Qualitäten wie Angaben zur Person des Unfallopfers, zum Unfallhergang, zur präklinischen und klinischen Akutversorgung und dem Outcome generiert. Basis der Dokumentation im TraumaRegister® bildet die Revision des AIS von 2015. Um eine Vergleichbarkeit der Daten sicherzustellen, wurde ein Basiskollektiv definiert. Dabei wird das Basiskollektiv von allen Patienten mit einem MAIS ≥ 3 sowie Patienten mit MAIS 2, die entweder verstorben sind oder auf einer Intensivstation waren, gebildet.

2.6 Epidemiologie und Folgen des Polytraumas

Bislang basierten die Angaben zur Anzahl der Schwerverletzten in der Bundesrepublik Deutschland auf zwei wegweisenden Publikationen aus den Jahren 2000 und 2006 (175, 176). Kühne et al. führten im Jahr 2006 eine Hochrechnung auf Basis von Daten aus 63 Kliniken mit insgesamt 2977 Fällen durch und ermittelten dabei eine Gesamtzahl von 35.300 schwerstverletzter Patienten pro Jahr für die Bundesrepublik Deutschland (176, 177). Die genaue Anzahl ist trotz intensiver klinischer und wissenschaftlicher Konfrontation bis heute nicht bekannt (177). Debus et al. untersuchten in einer retrospektiven Analyse im Jahr 2015 die Daten von Schwerverletzten mit einem ISS ≥ 16 aus dem TraumaRegister DGU®. Die Analyse der Daten war aus dem Grund von Relevanz, da es bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Schätzung der Anzahl der Schwerverletzten in der BRD auf Basis eines bundesweiten Registers mit prospektiv erfassten Daten gab. Auf Grundlage dieser Daten wurde eine erneute Hochrechnung der jährlich zu erwartende Anzahl Schwerverletzter vorgenommen. Sie erfassten ebenfalls Schwerverletzte mit einem ISS ≥ 16 , weshalb die Methodik von Debus et al. mit der von Kühne et al. vergleichbar ist. Aus der Analyse der seit dem gesammelten Daten ergeben sich ca. 18.300 schwerverletzte Patienten bei insgesamt 81.843.743 Einwohnern der Bundesrepublik Deutschland (BRD). Daraus berechnet sich eine Inzidenzrate von 0,02 % pro Jahr (177). Im Jahresbericht 2019 des TraumaRegister DGU® wurden für das Jahr 2018 17.664 Patienten mit einem ISS ≥ 16 erfasst (178). Dies deckt sich mit der Annahme, dass die Zahlen der Schwerstverletzten in den letzten Jahren weiter gesunken sind.

Die Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie gründete 2011 das TraumaNetzwerk DGU® (TNW), um die Versorgung der Schwerverletzten zu verbessern. Dabei handelt es sich um ein unabhängiges Zertifizierungsverfahren zur Optimierung der Schwerverletztenversorgung durch einheitliche Qualitätsstandards (179). Seither fand eine Zertifizierung von ca. 53 zu regional oder grenzüberschreitenden zusammengeschlossenen Traumazentren (Stand 2020) statt (179). Im Sinne der Schwerverletzten-Definition des Traumaregisters DGU® umfasste dieses Basiskollektiv im Jahr 2020 28.947 Fälle (43, 178). Die Letalität des Basiskollektivs liegt bei ca. 8,6 %. Dabei erfüllen jedoch nur 55 % das Kriterium ISS ≥ 16 und nur 15 % die Polytraumadefinition (Berlin) (37, 174). Dieser Score lässt sich für alle primär versorgten

Patienten berechnen und die Auswertungen der Daten beziehen sich nur auf das Basiskollektiv (14, 174).

In Deutschland sind die führenden Verletzungsursachen im Zuge eines Polytraumas der Verkehrsunfall (58 %) und Stürze (26 %) aus großer Höhe (180). 16 % der Polytraumata entstehen aufgrund von anderen Ursachen. 10 % der deutschen Bevölkerung erleidet jährlich eine Unfallverletzung, dabei dominieren allem voran leichtere Verletzungen, die ambulant versorgt werden können. Im Road Safety Report der World Health Organisation (WHO) aus dem Jahr 2018 wird die bedeutende Rolle von Verkehrsunfällen deutlich. Auch im TR-DGU® gehören Verkehrsunfälle mit 54,7 % zu den häufigsten Unfallmechanismen (181). Trotz dieses hohen Anteils liegt die Zahl der tödlichen Unfälle bei nur 4 pro 100.000 Einwohner in der BRD (182). Damit liegt die BRD weit unter dem internationalen Durchschnitt von 18 Fällen pro 100.000 Einwohnern (181). Der Anteil der polytraumatisierten Männer liegt bei 65 - 80 % und dominiert damit gegenüber den Frauen (183, 184). In der Altersverteilung um das 20. - 30. Lebensjahr ist der deutlichste Gipfel zu verzeichnen. Hier wird also deutlich, dass es sich bei dem schwerverletzten Patientenkollektiv meistens um gesunde und junge Menschen handelt (177). Dieser Umstand wird in der Wissenschaft mit einer erhöhten Risikobereitschaft und der Unerfahrenheit von Fahranfängern begründet (36, 184). Untersuchungen der WHO und des Harvard Zentrum für Entwicklungsstudien ergaben, dass bis zum Jahr 2020 mit einem Anstieg der Verletzten und Unfalldoten auf 8,4 Millionen Menschen zu rechnen ist. Als ein Grund hierfür wird der schnelle technische Fortschritt der dritten Welt genannt. Im Jahr 2020 starben in der EU etwa 18.800 Menschen bei einem Verkehrsunfall, das sind etwa 4000 Verkehrstote weniger als 2019 (wahrscheinlich aufgrund des geringeren Verkehrsaufkommen infolge der COVID-19-Pandemie (185, 186). Im Jahr 2018 verzeichnete die WHO alleine 1,35 Millionen Verkehrstote. Das sind 3700 Tote pro Tag, wovon zu 90 % Entwicklungsländer betroffen sind (187, 188). Außerdem sind Verletzungen im Zusammenhang mit Verkehrsunfällen die Haupttodesursache von Menschen zwischen 5 und 29 Jahren (56). Erfreulicherweise konnte die Überlebenswahrscheinlichkeit Schwerstverletzter in den letzten Jahrzehnten deutlich gesteigert werden. So lag die Letalität zu Zeiten von Dominique Larrey noch bei ca. 50 %. In einer retrospektiven Analyse von 3.406 Patienten aus den Jahren 1972 und 1991 konnten Regel et. al eine Regression der Letalität von anfangs 40 % auf nun 18 % vermelden (36).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die genaue Abschätzung der Anzahl Schwerverletzter in Deutschland sich immer noch als hochkomplex darstellt. Aus den oben beschriebenen Klassifikationen wird die schon lange bestehende Schwierigkeit deutlich, eine einheitliche sowie in der klinischen Praxis anwendbare Definition als auch Einteilung für das Polytrauma zu finden. Es ist bisher noch nicht gelungen alle klinischen, prognostischen als auch epidemiologischen Kriterien zu integrieren. Des Weiteren ist das Polytrauma ein Überbegriff für ein aus mehreren Verletzungen zusammengesetztes „Syndrom“. Es gibt für die

einzelnen Verletzungen, wie beispielsweise für das SHT, noch weitere etablierte Klassifikationen (siehe *Kapitel 2.4.2 Klinische Einteilung und Klassifikation der posttraumatischen Bewusstseinsstörung*). Ein optimaler Score würde sowohl die anatomische als auch die physiologische Komponente des vorangegangenen Traumas abdecken. Scoresysteme und Klassifikationen wie die AIS gehen dabei in die richtige Richtung. Durch die weltweite Verbreitung des ISS ist dieser gut geeignet, um einen Vergleich internationaler Kollektive zu ziehen. Die internationale Sterblichkeit in diesem Kollektiv liegt bei ca. 15 - 20 % (37, 43). Durch die Zertifizierung des TNW® und das Register des TR-DGU® kommt es seit nunmehr 30 Jahren zu einer immer einheitlicheren und flächendeckenden Erfassung von Daten. Somit lassen sich valide Daten für Publikationen sowie präklinische und klinische Abläufe erheben. Allerdings lassen sich diese Daten nicht unbedingt mit internationalen oder europäischen Daten vergleichen, da die Einschlusskriterien sowie die Definitionen der Polytraumas bis heute sehr variabel sind. Daher sind eine sensible Nutzung sowie eine eindeutige Bezugnahme der genannten Begriffe und Klassifikationen zukünftig von enormer Wichtigkeit, da schon bei der kleinsten Veränderung einer einzelnen Komponente die Aussagekraft eingeschränkt wird (37).

2.7 Verletzungsmuster

Tabelle 7: Verteilung der Verletzungen aller erfassten Patientenfälle

Patienten aus dem Basiskollektiv	100 % (n=92.484)	Abdomen	14,1 % (n= 13.075)
Kopf	45,9 % (n= 42.440)	Wirbelsäule	29,6 % (n= 27.366)
Gesicht	10,8 % (n= 9.967)	Arme	29,2 % (n= 26.967)
Hals	1,6 % (n=1.514)	Becken	15,2 % (n= 14.082)
Thorax	45,4 % (n= 42.004)	Beine	23,2 % (n= 21.407)

Darstellung des Basiskollektivs über die Jahre 2018 - 2020, übernommen aus dem Jahresbericht 2021 der DGU (173).

Um die Frage nach den am häufigsten betroffenen Körperregionen nach einem Trauma zu beantworten, werden die Daten des Traumaregisters der Jahre 2018 - 2020 herangezogen. Dargestellt sind die durchschnittlichen Verletzungsmuster der Patienten aus dem Basiskollektiv mit Verletzungen der neun Körperregionen gemäß des AIS mit einem Schweregrad von mindestens 2 Punkten (14).

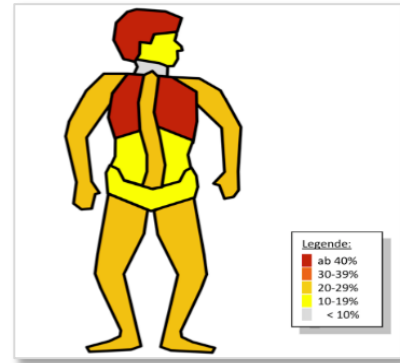


Abbildung 6: Verletzungsmuster im TR-DGU

„Relevante Verletzungen“ (*engl. serious injuries*) sind mit einem AIS-Schweregrad von ≥ 3 Punkten definiert. Die Prävalenzen der vier wichtigsten Körperregionen (Kopf, Thorax, Abdomen und Extremitäten) werden nach dem ISS eingeteilt, wobei Verletzungen der Wirbelsäule der entsprechenden Region Kopf, Thorax oder Abdomen zugeordnet werden (14).

Für das Basiskollektiv aus 2020, übernommen aus dem Jahresbericht 2021 der DGU (16, 173)

Tabelle 8: Anteil relevanter verletzter Patienten (AIS ≥ 3) pro Körperregion

Relevante Verletzungen (AIS ≥ 3)	TR-DGU 2018 - 2020
... des Kopfes	44,2 % (n = 33.341)
... des Thorax	46,3 % (n = 34.858)
... des Abdomens	11,9 % (n = 8.941)
... der Extremitäten und oder Becken	28,2 % (n = 21.252)

Darstellung der Jahre 2018 - 2020 (Basiskollektiv) übernommen aus dem Jahresbericht 2021 der DGU (174).

2.8 Therapie und Diagnostik

Die Mortalitätsrate des Polytraumas bzw. des SHT ist in der BRD seit Jahren rückläufig. Dies ist auf die effektivere Versorgung in der präklinischen Phase sowie der besseren supportiven Intensivtherapie zurückzuführen (189). Bislang erfolgt die Behandlung von SHT-Patienten symptomatisch. Anhand der klinischen Begutachtung, der Bildgebung, gemessener (Vital-) Parameter und regelmäßiger Laborkontrollen kann der Zustand der Patienten beobachtet und ggfs. eingegriffen werden. Das Schicksal der polytraumatisierten Patienten wird maßgeblich durch die Behandlungsstrategien innerhalb der ersten 24 h bestimmt (49). Daher ist für die Primärversorgung eine flächendeckende notärztlichen Versorgung unter Einbeziehung der Luftrettung von enormer Relevanz (49). Ferner ist der zügige Transport in das nächstgelegene Traumazentrum zu gewährleisten (49). In der präklinischen und klinischen Phase steht die Erhebung des neurologischen Kernbefundes und der äußeren Verletzungszeichen im Vordergrund. Dem schließt sich eine radiologische Bildgebung an, um das Ausmaß der

Verletzungen und eine akut lebensbedrohliche Situation zu erkennen oder auszuschließen. Die kraniale CT-Untersuchung ist hierbei der Standard zur Diagnostik therapierelevanter Blutungen, Ödeme oder knöcherner Verletzungen. Kleinere Verletzungen, wie z.B. Läsionen im Hirnstamm, sind in der CT nicht immer zu detektieren. Daher schließt sich in manchen Fällen eine MRT Untersuchung an. Diagnostizierte Hirnödeme oder Hirndruck können durch neurochirurgische Interventionen in einen physiologischen Bereich korrigiert werden (190). Hyperkapnien, Hypoxämien, arterielle Hypotonien, Hyperthermien und Hyperglykämien können das Ausmaß des Sekundärschadens negativ beeinflussen und so haben intensivmedizinische Therapieansätze das Ziel, möglichst physiologische Stoffwechselbedingungen herzustellen, um die Expansion des sekundären Hirnschadens einzudämmen (15). Zudem steht die Vermeidung von Komplikationen wie Infektionen, Gerinnungsstörungen, Elektrolytentgleisungen im Fokus (44). Zur Überwachung der Vitalfunktionen erfolgt die Messung der Herzfrequenz, der Sauerstoffsättigung, des Blutdrucks, der Körpertemperatur sowie das Ableiten eines Elektrokardiogramms (EKG). Der systolische Blutdruck eines Erwachsenen sollte bei > 90 mmHg liegen. Entscheidend ist, dass ein arterieller Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) von unter 60 mmHg (je nach Lebensalter) bzw. eine arterielle Sauerstoffsättigung von unter 90 % vermieden wird. Um dies zu erreichen, sollte eine frühzeitige, evtl. auch präklinische, Sicherung der Atemwege erfolgen und je nach Zustand die Indikation einer endotrachealen Intubation bei $\text{GCS} < 9$ gestellt werden. Zudem sollten Begleitverletzungen, z.B. Hämato- und Pneumothoraces, ausgeschlossen werden. Außerdem gehören offensichtliche Blutungen gestillt und Flüssigkeitsverluste sollten durch Volumensubstitution ausgeglichen werden (44, 191). Ein weiteres Überwachungsverfahren in der Neurotraumatologie ist die Überwachung des Hirndrucks. Zur Bestimmung des ICP kann eine intraventrikuläre oder intraparenchymatöse Hirndrucksonde gelegt werden. Dabei erfolgt parallel die Ableitung des MAP und eine Berechnung des zentralen zerebralen Perfusionsdrucks folgt, welcher laut Leitlinien einen Sollwert von 50 - 70 mmHg haben soll. Der ICP sollte unterhalb von 20 mmHg bleiben. Osmotherapeutische Medikamente wie Mannitol oder hypertone Kochsalzlösung werden zur Hirndrucksenkung eingesetzt. Zudem ist eine medikamentöse Senkung des Sauerstoff- und Nährstoffverbrauchs mittels Sedativa möglich, um das Hirngewebe weniger anfällig für die Folgen einer verminderten Perfusion zu machen. Zudem versucht man, ein Absinken des Blutdrucks mittels Medikamenten zu verhindern, da ein Abfallen des Blutdrucks und die damit verbundene Mangel durchblutung zu cerebraler Hypoxie führen kann. Außerdem kommt zur Senkung des intrakraniellen Drucks die zeitweise Entfernung des Schädelknochens (Kraniotomie) in Frage, um dem Gehirn den benötigten Raum zu geben und so zur Senkung des Drucks beizutragen (192). Das Einlegen einer Ventrikeldrainage ist eine weniger invasive Methode, den Hirndruck zu senken. Konservative Verfahren zur Senkung des Hirndrucks sind die Oberkörperhochlagerung (< 30 Grad), achsengerechte Lagerung und die Analgosedation. Laut wissenschaftlicher Studien

haben Patienten, die auf eine therapeutische Senkung des Hirndrucks ansprechen, ein um 64 % niedrigeres Sterberisiko (193). Allerdings besteht bislang noch nicht die Möglichkeit, mittels bisher etablierter klinischer Therapien in die oben genannten pathophysiologischen Prozesse des Sekundärschadens zu intervenieren. Daher sind die beschriebenen Regulationsmechanismen im Fokus aktueller Forschungen. Beispielsweise wirkt die Gabe des Antioxidans N-Acetylcystein auf Ebene der Zytokine, indem es die Menge von IL1- β und TNF- α verringert (139). In Tierexperimenten wurde gezeigt, dass das Glukokortikoid Methylprednisolon die Expression von TNF- α sowie diverser anderer Zytokine reduziert. Des Weiteren senkt das Antibiotikum Minocyclin die Expression von IL1- β nach SHT (156). Erythropoetin mindert genregulatorisch die Konzentration mehrerer pro-inflammatorischer Zytokine (117). Die beschriebenen Ansätze sind, trotz vielversprechender tierexperimenteller Ergebnisse, in der klinischen Erprobung bisher leider noch nicht umsetzbar gewesen.

2.9 Prognose, Langzeitergebnis und ökonomische Auswirkungen

Gegenstand heutiger Diskussionen sind nicht mehr nur die Überlebensraten von Patienten nach Polytrauma oder SHT, sondern auch die Überlebensqualität und das neurologische Langzeitergebnis (194). Rehabilitative Maßnahmen schließen sich an die meisten Aufenthalte nach schwerem SHT an, bei denen nicht selten dauerhafte physische, psychische und kognitive Beeinträchtigungen bestehen bleiben (195). Die Abschätzung der Prognose ist dabei als multidimensional zu betrachten. Diese lässt sich nicht anhand von einzelnen Parametern abschätzen, sondern es spielen das Ausmaß des Primär- und Sekundärschadens, die Tiefe und Dauer einer möglichen Bewusstlosigkeit, die posttraumatische Amnesie sowie der initiale GCS eine prognostische Rolle (196, 197). Eine aufgetretene Hyperthermie, Hypoxie, ein hoher ICP, hohes Patientenalter sowie weitere personenbezogene Faktoren stellen negative Prädiktoren für die Regeneration des Patienten dar (196-198). Jennett und Bond haben 1975 die Glasgow Outcome Scale (GOS) beschrieben, mittels der sie den Grad der Erholung nach Hirnschädigung versucht haben objektiv sowie standardisiert zu beschreiben (199). Dabei wird zur Prognoseabschätzung über den Langzeitverlauf und das Wiedereingliederungspotenzial in Beruf und Sozialleben der neurologische Status des Patienten in eine von fünf (bzw. je nach Version acht) Kategorien eingeteilt. An dieser Einteilung wird allerdings kritisiert, dass vor allem die physischen Probleme und weniger die kognitiv bzw. emotionalen Defizite berücksichtigt werden (200).

Von 846 eingeschlossenen Fälle einer retrospektiven Studie aus dem Jahr 2002, welche zuvor als schweres SHT (GCS < 9) kategorisiert wurden, zeigten nach einem Jahr 31,56 % ein gutes (GOS 5), 14,07 % ein moderates (GOS 4) und 24,35 % ein ungünstiges (GOS 3) neurologisches Ergebnis. 0,59 % der Patienten wiesen einen vegetativen Status (GOS 2) auf und 29,43 % erlagen der Folgen des SHT (GOS 1) (196).

Tabelle 9: Glasgow Outcome Scale und neurologisches Behandlungsergebnis

GOS 1	Tod	Schwerste Schädigung mit Todesfolge
GOS 2	Apallisches Syndrom; vegetativer Zustand	Schwerste Schädigung mit andauerndem Zustand von Reaktionslosigkeit und Fehlen höherer Geistesfunktionen
GOS 3	Sehr schwere Behinderung	Schwere Schädigung mit dauerhafter Hilfsbedürftigkeit im Alltag
GOS 4	Moderate Behinderung	Keine Abhängigkeit von Hilfsmitteln. Arbeit in spez. Einrichtungen möglich
GOS 5	Keine/leichte Behinderung	Leichte Schädigung mit geringen neurologischen und psychologischen Defiziten

Da vor allem junge Menschen im arbeitsfähigen Alter im Laufe ihres Lebens von einem Polytrauma betroffen sind, verursacht dies einen enormen medizinischen, psychosozialen und volkswirtschaftlichen Schaden. Der Verlust an Lebensarbeitsjahren und der damit verbundene Produktionsverlust durch die verschiedenen Todesursachen liegt in Deutschland bei den unter 45-Jährigen bei ca. 300.000 Arbeitsjahren pro Jahr (201). Darunter liegen die Krebserkrankungen mit ca. 240.000 Arbeitsjahren (201). Somit lassen sich mittels der Daten des statistischen Bundesamts volkswirtschaftliche Kosten für Unfalltote unter 45 Jahre von ca. 11 Milliarden Euro pro Jahr berechnen (202). Die Behandlungskosten eines einzelnen Polytrauma Patienten liegen im Durchschnitt bei 30.000 – 60.000 Euro, die jährlichen Kosten in der BRD belaufen sich somit auf 15 Milliarden Euro (9, 10, 203-206). Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) entstehen weltweit für die Verletzten im Straßenverkehr Kosten in Höhe von über 500 Milliarden Euro (181, 207, 208).

2.10 Tierexperimente als Modelle

Die ökonomische Haltung, kurze Generationszeit und die Möglichkeit der genetischen Veränderung der Mäuse sind wichtige Gründe, wieso bei tierexperimentellen Modellen wie in der vorliegenden Arbeit, Versuchstiere zum Einsatz kommen. Die tierexperimentelle Forschung ist aufgrund der Komplexität und Verschiedenartigkeit des Polytraumas für die Entwicklung neuer und erfolgsversprechender Therapien essenziell (209, 210). Die Entwicklung von Ersatzmethoden ist auf dem Vormarsch, allerdings haben diese bisher noch nicht den nötigen Entwicklungsstand erreicht, um einen Ersatz für Tierversuche darzustellen. Das Blue Brain- Projekt verfolgt die Vision, mittels computerbasierter Stimulation eines neuronalen Netzes in Zukunft die Funktion des Gehirns eines Nagers nachzuahmen (211). Nager sind aktuell die bevorzugt verwendete Spezies zur tierexperimentellen Erforschung des Polytraumas/Schädelhirntraumas. Untersuchungen am Schwein und an Wiederkäuern stellen bislang die Ausnahmen dar (212). Für die Auslösung eines SHT stehen mehrere etablierte

Modelle bei Mäusen zur Verfügung (213). Das in dieser Dissertation beschriebene Modell des Controlled-Cortical-Impacts (CCI) wurde 1988 von Frettschen et al. erstmals beschrieben und seitdem mehrfach modifiziert (214). Aufgrund der hohen Validität, guten Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit mit einem offenen SHT spielt dieses Verfahren bis heute eine wichtige Rolle. Zudem ähneln die durch ein SHT in der Maus verursachten Kontusionen histopathologisch dem Verletzungsmuster der menschlichen SHT Patienten (215). Auch in der Frakturforschung wurden in der Vergangenheit zahlreiche Erkenntnisse über die Physiologie der Knochenbruchheilung durch klinische Studien am Menschen als auch durch In-vitro Studien gewonnen. Trotzdem sind auch hier Tiermodelle bislang essenzieller Bestandteil der Frakturheilungsforschung. Die verschiedenen Säugetiere haben eine große Ähnlichkeit ihres Genoms. Obgleich werden bestimmte Gene, abhängig von der jeweiligen Gattung, zu verschiedenen Zeitpunkten exprimiert. Daher sollte die zeitliche Expression von Zytokinen immer im Zusammenhang mit den spezies-abhängigen Unterschieden gebracht werden (164). Nach der anfänglichen Etablierung von Großtiermodellen zur Untersuchung von Knochenbrüchen sind in jüngerer Vergangenheit aufgrund von geringen Kosten für Beschaffung, Zucht und Haltung auch Kleintiermodelle zunehmend etabliert worden (216). Jedoch besitzt die Maus im Gegensatz zum Menschen eine recht primitive Knochenstruktur ohne Harvers Systems, so dass dies bei der Übertragung von Ergebnissen auf den Menschen stets beachtet werden sollte. Ferner verlangt die diffizile Anatomie dieses Tieres ein hohes Maß an handwerklichem und operativem Geschick. Bei einer Femurlänge von etwa 15 mm und einem Durchmesser von etwa 1,5 mm, erfordert die Frakturierung und die osteosynthetische Stabilisierung viel Übung (217). Bonnarens und Einhorn entwickelten 1984 ein erstes Femur-Fraktur-Modell in der Ratte (216). Dieses wurde im Jahr 2004 von Manigrasso und O'Connor weiterentwickelt. Dabei verwendeten sie eine stumpfe Guillotine um einen standardisierten, transversen Frakturverlauf mit minimalem Weichteilschaden auszulösen (170). Nachteil bei dieser Methode ist die unzureichende Rotationsstabilität im Frakturbereich. Aus diesem Grund konzipierten Holstein et al. 2009 eine rotations- und zusätzlich achsenstabile intramedulläre Kompressionsschraube, welche in der Art in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz gekommen ist (218).

3 Ziel der Dissertation

Das Ziel dieser Studie ist es, ein tierexperimentelles Modell eines Polytraumas mit einer Kombination aus Schädelhirntrauma und Femurfraktur zu etablieren, welches die klinische Situation polytraumatisierter Patienten realitätsnah simuliert und die wechselseitigen Auswirkungen beider Traumata einer initialen Charakterisierung nach Kurzzeitüberleben zugänglich macht. Gerade kurzfristige Auswirkungen eines experimentellen SHT mit einer kombinierten Knochenfraktur auf die neurologischen Defizite und Verhaltensänderungen der Maus sind noch weitgehend unbekannt (219). Mit der Etablierung dieses Polytrauma-Modells sollte insbesondere der Einfluss der Knochenfraktur auf die Pathophysiologie und Immunantwort nach SHT zu einem möglichst frühen Zeitpunkt untersucht werden. Anhand klinischer, histopathologischer und immunologischer Untersuchungen werden die Auswirkungen einer Kombination von CCI + FF untersucht und mit den Veränderungen der Einzelverletzungen (isoliertes Schädelhirntrauma bzw. Femurfraktur) verglichen. Die resultierenden Ergebnisse sollen perspektivisch die Identifizierung und Charakterisierung von Faktoren mit wechselseitigen Funktionen für Hirnschädigung, Knochenheilung und Genesung ermöglichen. Dadurch könnte diese Dissertation neue Erkenntnisse über Biomarker und zukünftige Behandlungsstrategien ergeben. Somit soll die Grundlage für ein fundiertes Verständnis für klinische, histopathologische und immunologische Kaskaden im Rahmen eines Polytraumas gebildet werden. Im Rahmen dieser Studie sollten Anhaltspunkte für die Klärung folgender Fragen gefunden werden:

1. Führt die Kombination von SHT und Femurfraktur zu einer Veränderung des klinischen Zustands, sprich, wie verändert sich das Aktivitätsverhalten, das Körpergewicht und das neurologische Outcome der Versuchstiere? Welche Veränderungen lassen sich in motorischen Tests feststellen? Wie verändert sich das Angstverhalten der Versuchstiere?
2. Welche Auswirkungen hat eine FF auf das kortikale und subkortikale Läsionsvolumen und die Inflammationsreaktion im Gehirn der Mäuse?
3. Welche Veränderungen der Genexpression verschiedener Inflammationsmarker lassen sich nach einem simultanen Schädelhirntrauma und einer Femurfraktur beobachten?
4. Welche Auswirkungen hat eine Femurfraktur auf die Proteinkonzentration der Biomarker Progranulin und Osteopontin im Plasma?

4 Material

4.1 Geräte

- CCI-Device, Benchmark™, Stereotaxic Impactor: Leica Biosystems, Wetzlar, DE
- CryoStar NX70 Kryostat, Thermo Scientific: Thermo Fischer Scientific, Walldorf, DE
- Faxitron MX20, Faxitron Bioptics, LLC, Tucson, Arizona, USA
- Heizmatte: AccuLux, ThermoLux; Conrad, Murrhardt, DE
- Homogenisator, Mastermill MM 300: Retsch Technology GmbH, Haan, DE
- Inkubator, Babytherm IC8000: Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck, DE
- Isofluran Vapor, Dräger, Lübeck, DE
- Käfig, Typ 2 L: Bioscape GmbH, Castrop-Rauxel, DE
- Light Cycler® 480 System: F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
- Magnetrührer, MR 3001: Heidolph Instruments, Schwabach, DE
- Microprobe Thermometer, BAT 12, Physitemp, New Jersey, USA
- Mikro-Handbohrer, Uni-Drive N Komplettgerät: Paggen, Starnberg, DE
- Mikroskop:
 - Stemi 305 mit AxioCam 105 Color: Zeiss Oberkochen, DE
 - Fluoreszenzmikroskop (Imager M1): Zeiss, Oberkochen, DE
- Microplate absorbance reader, MRX TC II, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA
- Mikrozentrifuge, Micro Star 17R: VWR International, Darmstadt
- MouseScrew, RISystem AG, Davos, CH
- Odyssey Imaging System: Li-Cor, Lincoln, NE, USA
- Schüttler, Rotamax 120: Heidolph Instruments, Schwabach, DE
- Spektrophotometer, NanoVue®: GE Healthcare, Little Chalfont, UK
- Stereotaxie-Einheit: David Kopf Instruments, Tujunga, USA
- Tierschrank: UniProtect THF 3378-VO2, Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, DE
- Vortexmischer, Reax Control: Heidolph Instruments, Hamburg, DE
- Waage, DIPSE 2000g/0,1g, Oldenburg, DE
- Zentrifuge, Centrifuge 5804 R/5415 C: Eppendorf AG, Hamburg, DE

4.2 Verbrauchsmaterialien

- Deckgläser: Diagonal GmbH & Co KG, Münster, DE
- Einbettmedium, Neg 50™-Gefrierschnittmedium, Thermo Scientific, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
- Einstreu, Lignocel® FS14: J.Rettenmaier & Söhne GmbH+CoKG, Rosenberg, DE
- Einweg-Handschuhe: Safe Ex, SafeMed, Zimmerwald, CH
- Eppendorf Gefäße: Eppendorf, Hamburg, DE
- Falcon (50ml): Sarstedt, Nümbrecht, DE
- Faltenfilter: Whatman GmbH, Dassel, DE
- Gewebekleber, Histoacryl®: Braun AG, Berlin, DE
- Immu-Mount®, 9990402: Thermo Scientific, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
- Injektionskanüle: 23G x 1 ¼“ – Nr.14 (0,6 x 30mm)
- MouseScrew® Nagel (17,2mm) RISystem AG, Davos, CH

- Nahtmaterial: Perma-Hand™ Seide Nahtmaterial, Stärke 6-0, 45 cm Länge (Ethicon)
- Objektträger, SuperFrost®Plus: Thermo Scientific GmbH, Menzel, Braunschweig, DE
- Papierhandtücher, ZZ Falz: Schuch Laborhandel und Klinikbedarf, Langgöns, DE
- Parafilm: Laboratory Film, 2 IN x 250 FT. Roll, Menasha, USA
- Pelletiertes Spezialfutter: ssnif Spezialdiät GmbH, Soest, DE
- Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl): Sarstedt, Nümbrecht, DE
- Pipettenspitzen (5 ml): Labcon North America, Petaluma, USA
- Reaktionsgefäße: Eppendorf, Hamburg, DE
- Skalpelle: B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
- Superfrost® Plus Slides, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

4.3 Arzneimittel

- Bepanthen®-Augensalbe, Dexpanthenol: Bayer-Vital GmbH, Leverkusen, DE
- Fentanyl: 50 µg/kg KG, Janssen-Cilag NV, Beerse, BE
- Heparin 5000 I.U./ml, Ratiopharm, Ulm, DE
- Tramadol: 100mg/ml, Ratiopharm, Ulm, DE
- Forene (Isofluran): Baxter, Deenfield, USA

4.4 Chemikalien und Puffer

- *Aqua destillata* (lat., Aqua dest.): B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
- Chloroform: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI); Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Ethanol absoluta > 99,8 %: AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
- Kresylviolett-Acetat: Merck, Darmstadt, DEU
- Flüssiger Stickstoff: Air Liquide S.A., Düsseldorf, DE
- HyClone®, Bovines Serumalbumin (BSA) Pulver: GE Healthcare, South Logan, UT, USA
- Isopropylalkohol (GMP): Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart, DE
- Isotone Kochsalzlösung, 0,9 % NaCl: B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
- Kresylviolett Acetat: Merck AG, Darmstadt, DE
- Normal Goat Serum (NGS): Bio Rad, Hercules, CA, USA
- Paraformaldehyd (PFA): Merck AG, Darmstadt, DE
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Dulbecco's: Biochrom GmbH, Berlin, DE
- RNase-freies Wasser: Fermentas, St. Leon-Rot, DE
- Roti®-Histokitt: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
- Roti®-Histol: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
- Triton X-100: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

4.5 Antikörper

4.5.1 Primäre Antikörper

- Anti-GFAP Rat, Monocl. Antibody Clone 2.2B10, Thermo Fisher Scientific Cat# 13-0300, Life Technologies, Verdünnung: 1 : 500
- Anti-Iba-1 Rabbit, Wako Cat. #019-19741: Wako Chemicals GmbH, Neuss, DE, Verdünnung: 1 : 1000
- Rabbit anti-GFAP, M0761, Dako Omnis/ Agilent, Santa Clara, US, Verdünnung 1 : 1000
- Mouse anti-all spectrin/fodrin- α GA60761-2, Dako Omnis/ Agilent, Santa Clara, USA Verdünnung 1 : 1000
- Mouse anti-GAPDH, ACR001PT, Acris Antibodies GmbH/OriGene Rockville, USA; Verdünnung 1 : 1000

4.5.2 Sekundäre Antikörper

- Goat anti-Rat IgG (H+L), polyclonal, cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 488, Cat# A-11006; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Verdünnung: 1 : 500
- Goat anti-Rabbit IgG (H+L), polyclonal, Alexa Fluor 568, Cat# A-11011; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Verdünnung: 1 : 500
- Goat anti-rabbit IRDye antibodies Li-Cor, Nebraska, USA, Verdünnung 1 : 15000
- Goat anti-mouse IRDye antibodies), Li-Cor, Nebraska, USA, Verdünnung 1 : 15000

4.6 Kits

- Absolute Blue qPCR-Mix, SYBR-Green, Rox Vial: Thermo Fisher, Waltham, MA, USA Kapa Probe Fast qPCR: PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
- Light Cycler[®] 480 Probes Master: Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, CA, USA
- Quantikine[®] ELISA Mouse/Rat Osteopontin (OPN/SPP1) Immunoassay, R&D Systems, Inc., Abingdon, UK
- Quantikine[®] ELISA Mouse/Rat Progranulin (PGRN) Immunoassay, R&D Systems, Inc., Abingdon, UK
- QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen N.V., Venlo, NL
- RNeasy R Plus Universal, Qiagen N.V., Venlo, NL
- RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit: Qiagen N.V., Venlo, NL

4.7 Software

- EndNote, X9 für Mac: Thomas Reuters Corporation, New York City, USA
- Faxitron x-ray, Specimen Radiography System with Image Assist[™], Hologic© Wiesbaden, DE
- GraphPrism 8 für Mac OS X Version 8.0c: GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
- ImageJ, Version 1.47v: National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA
- Odyssey SA Imaging Systems, Li-COR Biosciences GmbH, Lincoln, LE, USA
- Zen 2 (blue edition): Zeiss, Jena, DE

- Image Studio, Version 3.1, Acquisition Software, Li-COR Biosciences GmbH, Lincoln, LE, USA
- Microsoft Word für Mac, Version 16.4, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
- Microsoft Excel für Mac: Version 16.4, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
- Light Cycler® 480 Software, Version 4.5: F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
- SigmaPlot 13.0, Systat Software GmbH, Erkrath, DE
- EthoVision XT, Version 14.0, Noldus Information Technology BV, Wageningen, NL

4.8 Hergestellte Lösungen

Eigene Herstellung von Paraformaldehyd 4 % (PFA):

235 ml *Aqua dest.* werden mit 18,8 g abgewogenen Paraformaldehyd vermenget. Dieses Gemisch wird für eine Dauer von 30 - 40 min auf 70 Grad Celsius (°C) unter Einsatz eines Magnetrührers erhitzt. Es folgt die Zugabe von 470 Mikroliter (µl) 10 molares Natriumhydroxid und die erneute Durchmischung unter dem Abzug für 5 - 10 min. Die Lösung wird durch einen Faltenfilter filtriert und mit 235 ml 0,2 molaren Phosphatpuffer nachgespült.

Eigene Herstellung der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS/T):

In 1 Liter (l) *Aqua dest.* werden 9,55 g PBS gegeben und gut durchmischt. Für die Herstellung von PBS/T werden 3 ml Triton X-100 hinzugegeben.

Eigene Herstellung der Blockierungslösung:

NGS wird auf 5 % und BSA auf 2 % verdünnt und in PBST gelöst.

Eigene Herstellung von Kresylviolett-Lösung:

In 100 ml Ethanol (100 %) werden 5 g Kresylviolett gelöst und für eine Dauer von 30 min mittels Magnetrührer bei 50 °C erhitzt. Die Lösung wird mittels 400 ml *Aqua dest.* auf 500 ml ergänzt, nun folgte die Filtration der Lösung über vier Stunden über einen Faltenfilter.

4.9 Primer und Sonden

Tabelle 10: Verwendete Primer und Sonden

Target	Basenabfolge 5' → 3'
C1QA-S	CGGGTCTCAAAGGAGAGAGA
C1QA-A	TATTGCCTGGATTGCCTTTC
C2-F	CGGTGGTAATTTACCCTCAG
C2-R	GGTGTGATGTGAGCTAGACCT
C3-F	CCAGCTCCCCATTAGCTCTG
C3-R	GCACTGCCTCTTTAGGAAGTC
Fos-F	CGGGTTTCAACGCCGACTA
Fos-R	TGGCACTAGAGACGGACAGAT
Mrc1-F	GGCTGATTACGAGCAGTGGA
Mrc1-R	ATGCCAGGGTCACCTTTCAG
OPN/Spp1-F	ATGTCATCCCTGTTGCCAG
OPN/Spp1-R	GACTGATCGGCACTCTCCTG
Ppia F	5'GCGTCTSCTTCGAGCTGTT
Ppia R	5'RAAGTACCACCCTGGCA
TNFa F	TCTCATCAGTTCTATGGCCC
TNFa R	GGGAGTAGACAAGGTACAAC
mu IL 1b 610	Cy5-CAGCTGGAGAGTGTGGATCCCAAGC--PH
mu IL 1b FL	TAATGAAAGACGGCACACCCACCC-FL
mulL 1b A	CAGGAAGACAGGCTTGTGCTC
mulL 1b S	GTGCTGTGCGACCCATATGAG
GFAP-F	CGGAGACGCATCACCTCTG
GFAP-R	TGGAGGAGTCATTCGAGACAA
mGRN-F	ATGCTGTGTGCTGTGAGGAC
mGRN-R	CACTCCACATTCCCAACCTT

5 Methoden

5.1 Versuchsplanung

5.1.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 43 weibliche, 18 - 25 g schwere, 8 - 9 Wochen alte Mäuse verwendet. Bei den Mäusen handelten es sich um Tiere des Stammes C57/BL6 aus dem Janvier Labor, lokalisiert in Le Genest-Saint-Isle in Frankreich. Die Tiere wurden während der Versuchsreihe in Gruppen zu je drei Tieren in Käfigen des Filtertop-Typ 2 gehalten. Diese wurden bei einer Temperatur von 22 – 24 Grad Celsius bei einer Luftfeuchtigkeit von 55 % in Tierschränken mit 12 Stunden (h) Tag-Nacht-Rhythmus aufbewahrt. Dabei bestand stets freier Zugang zu Futter und Wasser, die Nahrungsaufnahme erfolgte somit *ad libitum*. Der Tierversuchsantrag auf Durchführung nach Paragraphen (§) 8 des deutschen Tierschutzgesetzes wurde durch die Ethikkommission des Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz (G17-1-062) genehmigt. Die Durchführung der experimentellen Studie fand in den Laboratorien der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Mainz statt.

5.1.2 Versuchsaufbau

Basis für die vorliegende Promotionsarbeit sind Beobachtungen, Versuche und Studien anderer Forschungsgruppen. Dabei wurden die Auswirkungen der reziproken pathophysiologischen Beeinflussung von experimentellem SHT (CCI-Modell) und Femurfraktur auf den sekundären Hirnschaden und die Knochenheilung untersucht. Inhaltlich evaluieren diese Studien einen beobachteten positiven, also die Heilung fördernden Einfluss eines gesetzten CCI auf die Knochenheilung in einem Polytraumamodell mit kombinierter Femurfraktur (18, 20, 21). Umgekehrt wurde die Ausdehnung des sekundären Hirnschadens bei zuvor gesetztem SHT beobachtet (17, 18, 20, 21, 220). Den beschriebenen Studien wurde versucht nachzuempfinden und es wurden (Teil-) Schritte der vorliegenden Dissertation auf verschiedene Mitglieder der Forschungsgruppe Neuroprotektion aufgeteilt, um den wissenschaftlichen Statuten einer prospektiv randomisierten Doppelblindstudie gerecht zu werden. Die „ARRIVE-Guidelines“ wurden zur Aufrechterhaltung der ethischen Maxime und Verbesserung des Informationsgehaltes herangezogen (221). Während der operativen Phase wurde an den Mäusen in intraperitonealer (i.p.) Analgesie und in Inhalationsanästhesie eine Kraniotomie durchgeführt. Das SHT wurde per rechtsparietalem CCI am sichtbaren Cortex gesetzt und der Verschluss der Wunde fand mittels Einzelknopfnahse statt. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurde im direkten Anschluss das linke Femur frei präpariert, mittels steriler Kanüle das Mark eröffnet, eine Schraube des MouseScrew Kits eingeführt und das Femur mittels Gewichts frakturiert. Die Frakturkontrolle erfolgte im direkten Anschluss unter Anfertigung eines Röntgenbildes. Nach Ende der Narkose wurden die Mäuse in einen Inkubator umgesetzt und während der Aufwachphase nachbeobachtet. Während der

Beobachtungsphase wurden allgemeine verhaltensbiologische Beurteilungen prä- und postoperativ per Neurological Severity Score (NSS) erhoben. Zudem erfolgte die Beurteilung der motorischen Koordination mittels Beinbelastungstest. Der Abschluss der Beobachtungsphase wurde durch die Euthanasie, erneutem Röntgen, die Entnahme des Gehirns und die Gewinnung von Blut nach Dekapitation gebildet. Die Weiterverarbeitung der gefrorenen Gehirne erfolgte am Kryotom durch serielle koronale Hirnschnitte von rostral nach kaudal. Hierzu wurden serielle 12 Mikrometer (μm) dünne Schnitte in einem Intervall von 500 μm angefertigt und für die weitere Analyse auf Objektträgern (OT) asserviert. Zudem wurde mittels 60 μm dicken Trimschnitten Material für die sich anschließende RNA Extraktion gewonnen. Hierzu wurden 4 x 60 μm Schnitte anatomisch korrekt aufeinandergelegt, mittels Skalpell in Quadranten getrennt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in verschiedenen markierten Behältern aufbewahrt. Die RNA Extraktion erfolgte nach laboreigenem, standardisiertem Protokoll. Die Messung der extrahierten RNA wurde mittels Photometer bestimmt. Ein Teil der OT wurden mittels Nissl-Färbung gefärbt und fotografiert. Anschließend erfolgte die Ausmessung des Hirnvolumens mittels spezialisierter Software. Der andere Teil der OT wurde mit einem primären und sekundären, fluoreszierenden Antikörper gefärbt. Somit konnte die Quantität der Astrozyten als auch der Gliazellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie erhoben werden.

5.1.3 Studiendesign

Bei dem hier ausgewählten Studientyp handelt es sich um eine Vergleichsstudie. Die Hauptzielgröße belief sich auf den neuronalen Schaden, d.h. die Ermittlung der Volumetrie des Schadensareals in der Histologie. Die Nebenzielgrößen waren die Frakturheilungszeit und die Form des Knochenneubaus. Zudem war die Erhebung der neurologischen und motorischen Veränderungen anhand definierter Verhaltenstests von Relevanz. Ebenfalls fand eine immunhistochemische, molekularbiologische Analyse zum Zelltod, der Neuroinflammation und der Knochenheilung statt. Für die erste Teilstudie (Studie A1), die 5 d nach CCI und FF in der Akutphase abläuft, wurden drei Versuchsgruppen gebildet. Zudem wurde eine Vergleichsgruppe, bestehend aus scheinoperierten Mäusen (Sham), hinzugenommen. Dabei wurden die Tiere in Gruppen mit jeweils einem Unterscheidungsmerkmal randomisiert: 12 Tiere erhielten einen kontrollierten Hirnschaden (CCI-Modell), 12 Tiere erhielten eine Femurfraktur (FF), 11 Tiere erhielten ein Polytrauma (PT), zusammengesetzt aus einer Kombination einer FF und eines CCI und eine Vergleichsgruppe wurde aus $n = 8$ Tieren gebildet. Dargestellt wird dies in Tabelle 11. Den Mäusen in der CCI Gruppe wurde mittels Stereotaxie ein SHT gesetzt. Der FF Gruppe wurde mittels Schraube und Gewicht das linke Femur frakturiert. Eine Kombination aus den beiden Verfahren wurde an der Polytrauma Gruppe durchgeführt. Hier wurde zunächst ein SHT gesetzt und anschließend das Femur frakturiert. An der Vergleichsgruppe wurde eine Scheinoperation (engl. Sham-OP) durchgeführt. Hierbei wurde die Haut am Schädel eröffnet,

ein Hautschnitt am Femur gesetzt und beide Wunden im Anschluss vernäht. Die Tiere erhielten weder ein CCI noch eine FF. Die Narkose wurde mittels 4 % igem Isofluran eingeleitet und mittels 1,5 % igem Isofluran aufrechterhalten. Die Dauer der Narkose lag bei allen Gruppen bei ca. 50 Minuten. Bei den Versuchstieren wurde im Anschluss das Hirnläsionsvolumen bestimmt, die RNA extrahiert und eine Immunfärbung durchgeführt.

Tabelle 11: Gruppeneinteilung

Gruppe	A 1.1	A 1.2	A 1.3	A 1.4
OP	Sham	CCI	FF	PT
Überleben	5 d			
Anzahl	n = 8	n = 12	n = 12	n = 11

Die Gruppengröße/Fallzahl wurde mit dem statistischen Softwarepaket SigmaPlot 13.0 bestimmt. Zudem wurden die Fallzahlen von ähnlichen Experimenten anderer Forschungsgruppen übernommen. Die Durchführung der Experimente und die Auswertung erfolgte verblindet.

5.2 Versuchsdurchführung

5.2.1 Haltungsbedingungen

Die Tiere wurden vor und während der Experimente nach den institutionellen Richtlinien der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz gehalten. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Trinkwasser und pelletiertem Spezialfutter. Sie wurden in Typ 2 Filtertopfkäfigen, gefüllt mit entkeimten und entstaubten Weichholzeinstreu, gehalten. Um den Nestbautrieb zu bedienen und einen Rückzugsort zu schaffen, wurden Zellstoffpapierhandtücher sowie ein Polyvinylchloridrohr deponiert. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur (RT) zwischen 20 - 23 °C gehalten und die Luftfeuchtigkeit konstant auf 55 % reguliert. Im Laufe der Tag-Phase fanden sowohl die Versuche, Beobachtungen sowie die Manipulationen an den Versuchstieren statt.

5.2.2 Operationsvorbereitung

Die Tiere wurden 4 Tage vor Versuchsbeginn zu Adaptationszwecken in die Räumlichkeiten des Labors transferiert. Ein Tag vor der operativen Phase wurde das Körpergewicht (KG) aller Mäuse bestimmt und ein initialer Neuroscore erhoben. Außerdem wurde das Tier auf Anzeichen von Krankheit respektive Nicht-Eignung für die Operation untersucht. Hierbei kam es zu keinem Ausschluss eines der Versuchstiere. Zwei Tage vor der Operation wurde zur primären Schmerzbehandlung das Trinkwasser mit Tramadolhydrochlorid (100 mg / ml) versetzt. Hierbei wurden 150 ml Leitungswasser mit 60 Tropfen Tramadol vermengt und in die Trinkflasche einer Gruppe, d.h. n = 3 Mäuse, gefüllt.

5.2.3 Anästhesie

Die eingesetzten Geräte wurden auf ihre ordnungsgemäße Funktionsfähigkeit kontrolliert. Die Versuchstiere wurden zur Verhinderung einer Azidose und einer Hypoglykämie während der primären Medikamentengabe in ihren Käfigen gehalten. Somit wurde der freie Zugang zu Trinkwasser und Futter gewährleistet. Es erfolgte eine körperlsgewichtsadaptierte, i.p. Injektion von Fentanyl (50 µg / kg KGW) und nach einer Anflutungszeit von 15 min. wurde die weitere Anästhesie fortgesetzt. Die Tiere wurden mittels einer Inhalationsnarkose anästhesiert. Dazu wurden die Tiere für die Dauer von ca. 1 min unter eine Haube in einer Atmosphäre mit vierprozentigen (4 %) Isofluran gebracht, bis sämtliche motorischen Reaktionen erloschen waren. Hierbei wurde ein stressfreies Anfluten der Anästhesie gewährleistet. Die Überprüfung der Narkosetiefe erfolgte mittels Auslösung des Zwischenzehenreflexes der hinteren Gliedmaßen, welcher bei ausreichend tiefer Narkose erloschen ist. Die Aufrechterhaltung der Anästhesie erfolgte über das Darbieten eines Luft-O₂-Gemisch. Hierfür wurden 1,5 % Isofluran mit einem Flow von 0,5 Liter pro Minute (l / min) Frischluft und 1,0 l / min Sauerstoff über eine angepasste und abgedichtete Gesichtsmaske verabreicht. Um einer möglichen Austrocknung der Augen entgegenzuwirken, wurden diese mit Augensalbe versorgt. Die rektale

Körpertemperatur von 37 °C wurde während der operativen Phase mittels Temperatursonde gemessen und mittels Wärmeplatte aufrechterhalten, um einem unerwünschten und unkontrollierten Absinken der Körpertemperatur entgegenzuwirken. Die Narkosedauer für alle Tiere, unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, belief sich auf ca. 50 min. Die Mäuse zeigten während der gesamten Narkose eine suffiziente Spontanatmung.

5.2.4 Kraniotomie

Das Einspannen in einen stereotaktischen Rahmen der in Bauchlage positionierten Mäuse erfolgte nach Eintritt der Bewusstlosigkeit. Hierzu wurden diese am Oberkiefer bzw. den Incisivi fixiert, um eine unerwünschte Positionsänderung des Kopfes während des Eingriffes zu unterbinden. Die operative Maßnahme wurde mit einer ein Zentimeter (cm) langen medianen Inzision der Kopfschwarte begonnen. Anschließend erfolgte die stumpfe Freilegung des Schädelknochens durch Präparation und Lösung des Periosts. Hierzu wurde das freigelegte Periost mittels eines Wattestäbchens vom Knochen gelöst und an den Rand des Operationsfeldes geschoben. Der Schädelknochen wurde von der vorderen (Bregma) bis zur hinteren (Lambda) Koronarnaht freigelegt. Es folgt die Kraniotomie, wofür über der rechten Hemisphäre, entlang der anterioren Schädelnaht Bregma, dem lateral gelegenen Arcus zygomaticus und der posterioren Lambdanaht mit einem Minibohrer ein 4 x 4 mm breites quadratisches Bohrloch in den Schädelknochen gesetzt wurde. Dabei blieb die mediane Seite des gefrästen Rechtecks unberührt und fungierte beim Aufklappen der Kalotte nach medial als Scharnier. Bei der Bohrung des Schädelfensters wurde auf den vollständigen Erhalt der Dura mater geachtet.

5.2.5 Controlled Cortical Impact (CCI)

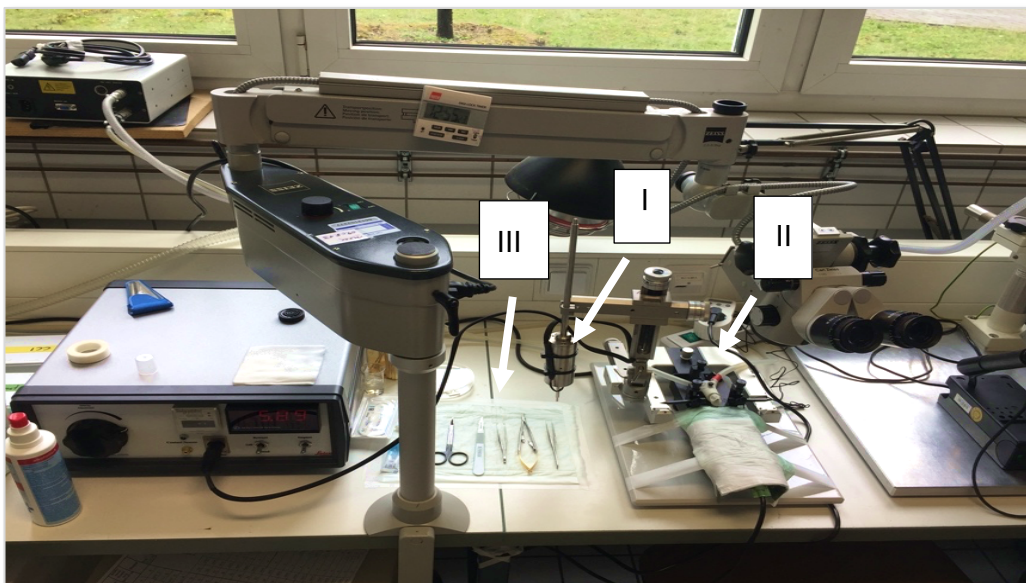


Abbildung 7: CCI Arbeitsplatz

Für das Setzen des Controlled Cortical Impacts (CCI) wird ein CCI-Impaktor (I) benötigt (Bei diesem können die Geschwindigkeit und Applikationsdauer eingestellt werden). Die Maus ist in einem stereotaktischen Rahmen (II) eingespannt. Zudem wird das Operationsbesteck benötigt (III).

Nach erfolgreicher Kraniotomie wurde der Schädelknochen nach medial weggeklappt und der Benchmark™ Stereotaxic Impactor über das rechtshemisphärisch liegende Bohrloch vertikal platziert. Der CCI Applikator besteht aus einem elektromagnetisch-betriebenen rigiden Stempel, der über eine separat steuerbare Einheit bedient werden kann. Der CCI von 3 mm Durchmesser wurde computergesteuert durch diese Einheit ausgelöst. Dabei wurde mittels elektromagnetisch betriebenen Bolzens mit einer definierten Geschwindigkeit von 6 Metern pro Sekunde (m / s), einer Eindringtiefe von 1,5 mm und einer Aufpralldauer von 200 Millisekunden (ms) ein moderater Hirnschaden erzeugt. Eventuell aufgetretene Blutungen werden gestillt, die aufgeklappte Schädelkalotte wurde zurückgeklappt, im Anschluss wurde der Schädelknochen mittels Histoacryl®-Gewebeleber in der ursprünglichen Position befestigt und die Wunde mittels nichtresorbierbarem Prolene®-Nahtmaterial der Stärke 6-0 in Einzelknopftechnik genäht. Die Versuchstiere wurden aus dem stereotaktischen Rahmen gelöst, zur Beobachtung für mindestens 1,5 h in einen beheizten Säuglingsinkubator transferiert und anschließend in den Tierschrank umgesetzt. Das CCI wurde bei n = 23 Tieren (CCI: n = 12 Tieren, Polytrauma: n = 11 Tieren) gesetzt. Die Dauer des operativen Eingriffs belief sich auf ca. 20 min, die Narkose wurde für ca. 50 min aufrechterhalten, um eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Gruppen zu gewährleisten.

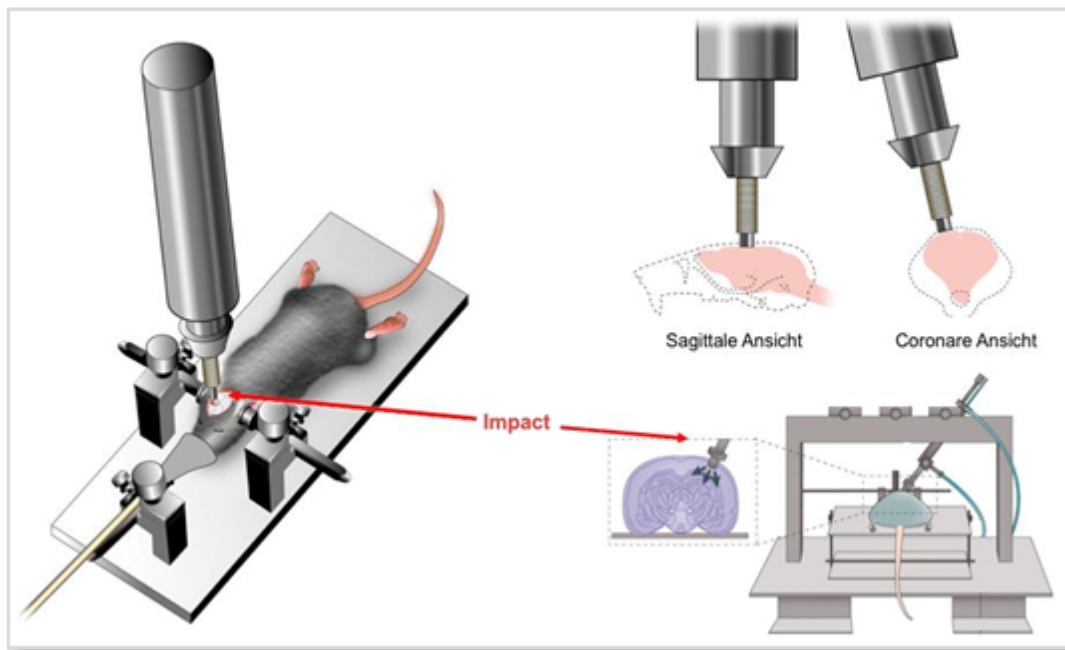


Abbildung 8: Versuchsaufbau des Controlled Cortical Impact (CCI)

Modifiziertes Bild nach Onyszchuk (220) und Xiong (221). Dargestellt ist der intraoperative Aufbau und das narkotisierte, in den Stereotaxierahmen eingespannte Versuchstier mit freipräparierter und eröffneter Kalotte.

5.2.6 Femurfraktur

Im direkten Anschluss an die CCI Operation wurde bei $n = 23$ der 43 Tiere (FF: $n = 12$, PT $n = 11$) eine reine kontrollierte Fraktur des linken Femurs vorgenommen. Die Narkoseeinleitung und Narkoseaufrechterhaltung erfolgte analog zum CCI Modell. Im Anschluss fanden zunächst die Rasur und die Hautdesinfektion im Bereich des Knies des linken Hinterbeines statt.

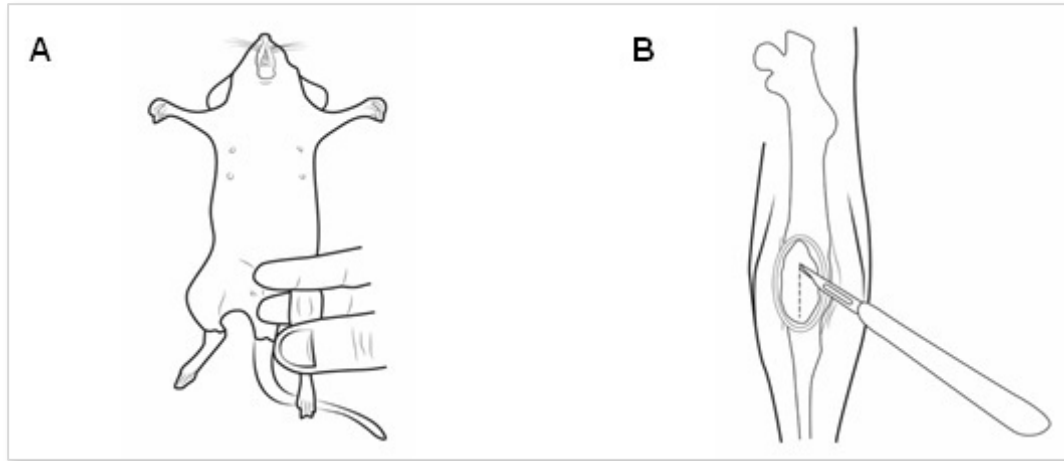


Abbildung 9: Operatives Vorgehen bei der Frakturierung des Femurs

Operativer Zugangsweg, parapatellare Hautinzision des linken Femurs, modifiziert von (222).

(A): Graphische Darstellung der Haltung des linken Femurs der Maus.

(B): Graphische Darstellung der paramediane Schnittführung entlang des Femurs

Die Durchführung der etwa 4 mm lange Hautinzision erfolgte parapatellar. Nach geringfügiger Mobilisation der Patella nach medial, wurde der Markraum mittels einer sterilen Injektionskanüle (23 Gauge) eröffnet und der 17,2 mm langer MouseScrew® Nagel eingeführt, dabei blieb die Patellasehne intakt. Nun wurde das Femur durch den Aufprall eines 200 g schweren Gewichts aus einer Höhe von 300 mm kontrolliert frakturiert. Mittels interfragmentärer Kompression wurden Dreh- und axiale Stabilität der Frakturfixierung erreicht. Die Frakturkontrolle erfolgte einmalig nach Setzen der Fraktur in Narkose, unter Verwendung eines mobilen Röntgengerätes. Der Hautschnitt wurde mit nichtresorbierbaren Nahtmaterial in Einzelknopftechnik verschlossen. Die MouseScrew® Implantate sind kommerziell erhältlich (RISystem®). Die Dauer der Operation betrug ca. 20 min., die Narkosedauer von 50 min wurde aber auch bei diesen Tieren eingehalten.

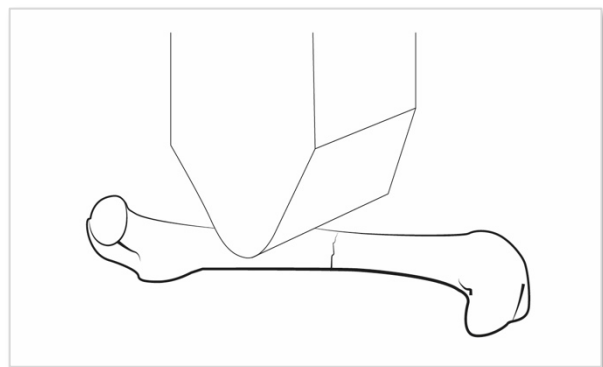


Abbildung 10: Erreichen einer Femurfraktur mit Hilfe eines 200 g schweren Gewichts, modifiziert von (222)

5.2.7 Scheineingriff

Die Operation der $n = 8$ Sham-Tiere erfolgte, analog zum CCI und FF Frakturmodell hinsichtlich Narkoseeinleitung und Analgesie. Die Schädelkalotte wurde präpariert, mittels Wattestäbchen im Operationsfenster aufgeraut und anschließend mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die Manipulation erfolgte, um auch bei diesem Eingriff eine mechanische Reizung auszulösen. Allerdings wurde bei dem Sham-Eingriff keine Kraniotomie vorgenommen, d.h. die Kalotte blieb verschlossen. Zusätzlich erfolgten die Hautinzision und die Präparation der Muskulatur am Oberschenkel des linken Femurs, wobei auch hier das Femur nicht frakturiert wurde. Im Anschluss wurde der Hautschnitt mittels Hautnähten verschlossen. Die Narkosedauer belief sich auch bei der Sham Operation auf 50 Minuten.

5.2.8 Röntgen

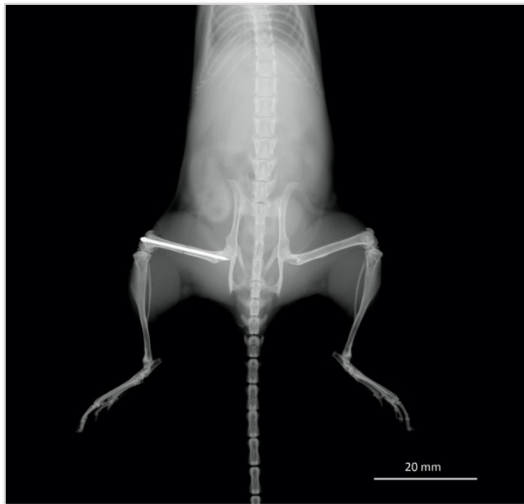


Abbildung 11: Repräsentative Darstellung eines Röntgenbildes eines Versuchstieres mit Osteosynthetisch versorgte Femurfraktur rechts. Skalierung: 1 cm.

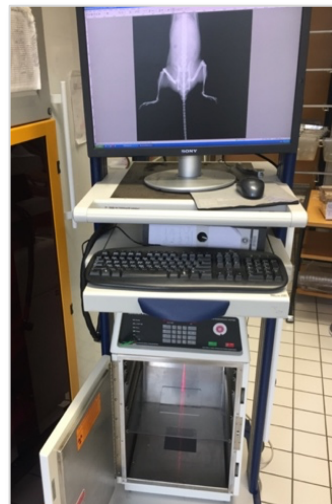


Abbildung 12: Frakturkontrolle mittels mobilen Röntgengeräts

Im Anschluss an die operative Phase erfolgte die Kontrolle der Fraktur. Diese wurde noch in Narkose und vor dem Verschluss der Hautinzision durchgeführt. Hierzu wurde ein Bild des in Bauchlage positionierten Versuchstiers mit einem mobilen Röntgengerät mit 35 Kilovolt (kV) und 5 Sekunden Belichtungszeit generiert. Zudem fand eine Kontrolle der Frakturheilung am Ende der experimentellen Phase, nach Euthanasie der Tiere, auf dieselbe Art und Weise statt.

5.3 Postoperative Phase

5.3.1 Aufwachphase und postinterventionelle Haltung der Tiere

Nach dem Aufwachen aus der Gasnarkose wurden die Mäuse für den Zeitraum der Aufwachphase in einen Inkubator transferiert. Dieser wurde auf 35 °C vorgewärmt und die in dem Inkubator herrschende Luftfeuchtigkeit betrug 35 %. Die Mäuse verweilten 1,5 h in dem Inkubator und wurden nach erster in Augenscheinnahme in die Tierkäfige zu ihrer restlichen

Gruppe umgesetzt. Während der Aufwachphase verstarb eine Maus aus der Sham-Gruppe.

5.3.1.1 Abbruchkriterien

Die Abbruchkriterien dieser Studie orientieren sich an der „ARRIVE Guideline“ (221). Hierfür wurde ein Score entwickelt, der dem Untersucher ermöglicht, anhand von klaren Kriterien abzuwägen, ob eine Tötung des Versuchstieres in Erwägung gezogen werden sollte oder nicht. Dabei wird eine Abnahme des Körpergewichts bis zu 20 % toleriert, sowie der Allgemeinzustandes des Tieres (Fell, Augen, Körperöffnungen), das Spontanverhalten (Bewegung, Überaktivität, Isolation, Apathie etc.) und versuchsspezifische Kriterien (Wundstatus) begutachtet. Innerhalb dieser Kriterien können je nach Schwere der ausgeprägten Symptome bis zu 20 Punkten vergeben werden. Ist ein Gesamtscore als auch ein Einzelscore von über 20 Punkten erreicht, z.B. bei Reduktion des Körpergewichts über 20 %, sollte es zu einer sofortigen Tötung des Versuchstieres durch eine zervikale Dislokation kommen. Keines der Versuchstiere wies eines der Abbruchkriterien auf und die Mortalität der Versuchstiere dieser Studie lag bei 2,32 % (eine Sham Maus verstarb am ersten OP-Tag 1).

5.3.2 Neurologische Testung

Die Durchführung der Verhaltenstests erfolgte in der vorliegenden Studie einmalig vor der Operation (pre-op) und postoperativ am ersten (d1), am dritten (d3) und fünften Tag (d5). Der Beinbelastungsscore erfolgte postoperativ an Tag 1, Tag 3 und Tag 5. Alle Untersuchungen erfolgten zur selben Tageszeit und durch einen verblindeten Untersucher der Arbeitsgruppe, um eine Vergleichbarkeit zwischen und innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen zu gewährleisten.

5.3.2.1 Neurological Severity Score

In der vorliegenden Studie wurde zur Objektivierung der neurologisch-motorischen Fähigkeiten einer Maus der etablierte Neurological Severity Score (NSS) angewandt. Dabei fand eine Evaluierung in den Kategorien Suchverhalten, Schreckreflex, Gangverhalten mit Koordination sowie Balance und motorische Lähmungserscheinungen statt. In den einzelnen Kategorien wurden Punkte verteilt und addiert. Ein gesundes Testtier sollte in Summe eine Punktzahl von null erreichen. Bei einer Summe von 13 Punkten wurde die maximale Verhaltensbeeinträchtigung erreicht. Der Ablauf der klinischen Testungen wird im Folgenden kurz erläutert: zunächst erfolgte die Testung der Reflexe. Hierfür wurde die Maus aus ihrem Käfig genommen und auf die Tischplatte gesetzt. Nun klatschte der Untersucher kräftig in die Hände, so dass dies nach Möglichkeit vom Versuchstier nicht visuell registriert wurde. Schreckte die Maus auf, handelte es sich dabei um das zu erwartende Verhalten und die Maus bekam hierfür null Punkte. Ein Ausbleiben der Schreckreaktion der Maus wurde mit einem Punkt bewertet. Dieses Verhalten spricht für ein Defizit der Reflexbögen, eine Störung der vestibulocochlearen Hirnnerven oder des Allgemeinbefindens. Anschließend beobachtete der

Untersucher das Suchverhalten, das „seeking Behaviour“ des Tieres. Schnüffelte das Versuchstier, erkundet es die Umgebung und stellt sich auf die Hinterbeine, bekommt dieses null Punkte. Zudem wurde der Gang des Tieres beobachtet, also ob es in der Lage war, geradeaus zu laufen. War eine dieser Verhaltensweisen nicht zu beobachten, bekam die Maus hierfür einen Punkt. Dies spricht für ein Aufmerksamkeitsdefizit bzw. eine eingeschränkte Wahrnehmung oder ein mögliches depressives Verhalten der Maus. Im Anschluss fand der „walking beam“ Test statt. Hierbei wurden die Balance und die feinmotorische Koordination getestet: Hierfür wurde das Versuchstier auf einen von drei unterschiedlich breiten Stäben platziert. Die Stabdicke belief sich auf ein, zwei oder drei cm. Die Stäbe wurden in ca. 30 cm Höhe installiert. Die Maus wurde zunächst auf dem Breitesten der drei Stäbe platziert. Sie sollte die Stäbe also in absteigender Reihenfolge ohne Herunterfallen oder Fehlritte überqueren. Wurden mehr als drei Pfoten falsch aufgesetzt oder lief die Maus unsicher, bekam sie hierfür einen Punkt. Fiel die Maus herunter, blieb sitzen oder bewegte sich nicht weiter fort, bekam sie hierfür zwei Punkte. Zum Abschluss wurden die Tiere auf einen runden und einen eckigen Stab gesetzt bzw. gehängt. Diese Stäbe haben einen Durchmesser von 0,5 cm. Hielt sich das Tier an diesem fest, wurde dieser vorsichtig gedreht. Konnte die Maus den Stab über 10 Sekunden mit allen vier Pfoten festhalten, wurde der Test erfolgreich absolviert und die Maus bekam hierfür keinen Punkt. Wenn eine oder mehrere Pfoten(n) vom Stab gelöst wurden oder die Maus sich nicht halten konnte, spricht dies für eine mögliche Hemiparese. Hierfür bekam die Maus einen Punkt. Zuletzt wurde das Versuchstier dahingehend untersucht, ob sich während der Fortbewegung eine vollständige Hemiparese, eine Monoparese oder keine paretischen Veränderungen zeigten. Dies wurde erneut mit Punkten von zwei bis null bewertet.

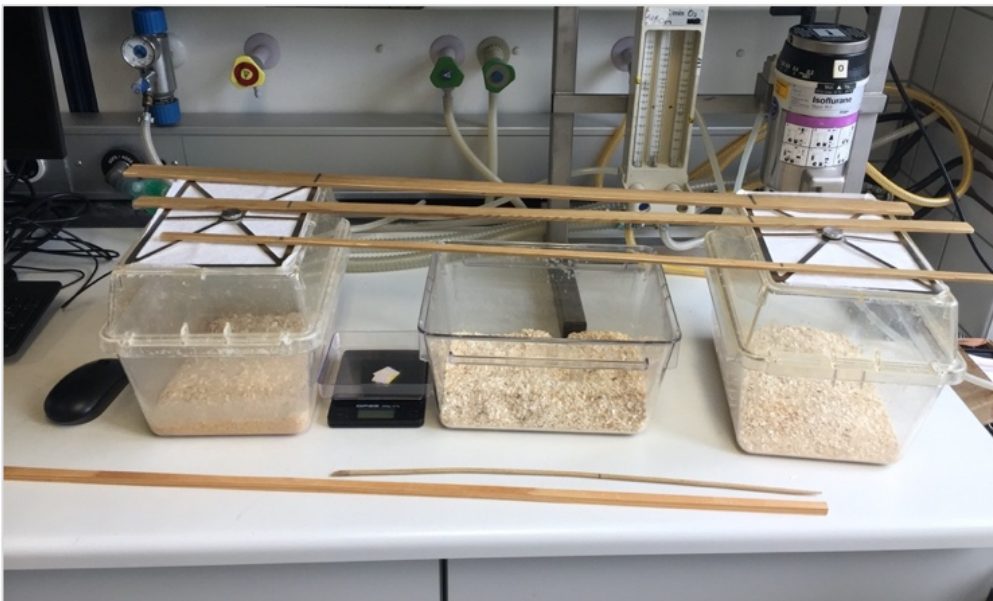


Abbildung 13: Walking Beam Test

Drei verschieden, breiten Stäben installiert in 30 cm Höhe. Eckiger und runder Stab sind in der vorderen Bildhälfte zu Erkennen.

5.3.2.2 NOLDUS-Auswertung

Ein weiterer Teil der Beobachtung umfasste das Verlassen eines Kreises (engl. exit from the circle) im open field Test (OFT): hierfür wurde die Maus in die Mitte eines virtuellen, im Durchmesser etwa 30 cm messenden Kreises in einer 40 x 40 x 40 cm große quadratische Box gesetzt. Dieser Kreis wurde von der EthoVision XT Software abgebildet. Eine Kamera und eine Lichtquelle sind oberhalb der Box festinstalliert. Mittels der Software wurde die Maus für eine Zeitdauer von drei Minuten beobachtet, dabei wurde die Maus anhand des center-points automatisiert erfasst. Unter normalen Umständen verlässt die Maus aufgrund ihres intrinsischen Fluchtverhaltens die Kreisformation (border zone) in etwa 30 Sekunden (s). Verzögertes Verlassen des Kreises wurde mit einem Punkt bei über 30 s, mit zwei Punkten zwischen 61 - 120 s und mit drei Punkten bei mehr als zwei Minuten bewertet. Durch diese Testung konnten Störungen im Angstempfinden aufgedeckt werden. Diese 0 - 3 Punkte wurden zum NSS dazu gerechnet.

5.3.2.3 Open Field Test

Zudem konnte die minimale sowie maximale Geschwindigkeit der Maus, die Durchschnittsgeschwindigkeit und die zurückgelegte Strecke bestimmt werden. Während der Untersuchungen konnte auf eine Parese der Extremitäten der Tiere geachtet und dabei ein besonderes Augenmerk auf die linken Gliedmaßen gelegt werden. Da es bei dem Setzen des CCIs zu einem Schaden im rechten Kortex kommt, resultiert daraus eine mögliche Beschädigung des Motokortexes. Hierdurch kann eine Parese der linken Extremität hervorgerufen werden, da die nervalen Strukturen, die die linke Körperhälfte versorgen, von der rechten Hemisphäre gesteuert werden. Zudem konnte hier eine Untersuchung des Angstverhaltens durchgeführt werden. Hierzu wurde quantitativ erfasst, wie häufig sich das Versuchstier in einem gewissen Zeitraum im OFT aufstellte (engl. rearing), sich mit zur Hilfenahme eines Gegenstandes, beispielsweise der Wand, auf die hinteren Gliedmaßen aufstellte (engl. supported rearing) oder den Körper verlängerte und dabei den Rücken absenkte (engl. stretch-attend postures (SAP)). Häufigeres Aufstellen sowie SAP werden mit einem stärker ausgeprägtem Angstverhalten in Verbindung gebracht (223, 224).

5.3.2.4 Beinbelastungsscore (BBS)

Der Beinbelastungsscore dient der ergänzenden Beobachtung, in wie weit die Versuchstiere die frakturierte Extremität bewegen können. Dieser erfolgte im Zeitintervall 1d, 3d und 5d nach der Operation. Die Punktevergabe erfolgte analog zum Neuroscore. Die maximal zu erreichende Punktzahl betrug 6 Punkte. Bei diesem Test wurde die Bewegung der Maus im Käfig, die Beinbelastung sowie die Beweglichkeit des Beines beobachtet. Alle drei Kriterien wurden mit normal (0 Punkte), wenig (1 Punkt) und keine bewertet (2 Punkte).

5.3.3 Euthanasie und Präparation

Nach Erhebung der letzten neurologischen Testung wurden die Tiere nach einer Überlebensdauer von 5d euthanasiert und anschließend die Gehirne zur weiteren histologischen Aufarbeitung entnommen. Die Tiere wurden für ca. 90 s in ein Becherglas gelegt, welches mit einem mit Isofluran beträufelten Tuch ausgelegt wurde. Hierdurch wurden diese in einen Zustand der tiefen Bewusst- und Schmerzlosigkeit versetzt. Nach Kontrolle des Ausbleibens der Atmung und der Reflexe wurde die Tötung des Tieres durch Dekapitation mithilfe einer Schere vorgenommen. Daraufhin wurden die Tiere der Femurfraktur- und der Polytraumagruppe geröntgt. Das Femur wurde anschließend freipräpariert, entnommen und einer anderen Arbeitsgruppe für die weitere Analyse zu Verfügung gestellt. Hiernach erfolgte die Freilegung des Gehirns über eine mediale Eröffnung der Haut und eine Präparation bis zum knöchernen Schädel. Ist das Okziput erreicht, wurde dieses medial eröffnet und eine Entfernung der Calvaria nach rostral vorgenommen. Um das Encephalon zu luxieren, wurden die Hirnnerven vorsichtig abgelöst und das Gehirn mittels eines kleinen Spatels aus der verbliebenen Schädelhöhle gelöst. Hierbei wurde auf die Unversehrtheit des Präparates geachtet. Das herausgelöste Gehirn wurde für 5 min in pulverisiertem Trockeneis gefroren. Die Aufbewahrung der Präparate erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in nummerierten, luftdichten Tüten. Parallel hierzu wurde das Blut aus dem Körperstamm in einem Falcon, welcher zuvor mit $80\text{ }\mu\text{l}$ Heparin gefüllt wurde, gesammelt und anschließend bei 3000 rounds per minute (rpm) für 8 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasmaabpipettiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.



Abbildung 14:
Gefrierpräparat 5
Tage nach CCI
Trauma

5.3.4 Kryosektion und Probengewinnung

Für die histologische Aufarbeitung wurden die entnommenen Präparate im Kryostat bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $12\text{ }\mu\text{m}$ messende, koronare Schnitte geschnitten. Das Gehirn wurde zunächst mittig auf einer kleinen Metallscheibe platziert. Dabei wurde bei der Einbettung mit einem speziellen Medium (Neg 50TM-Gefrierschnittmedium) auf die korrekte Ausrichtung des Präparates geachtet, um möglichst gleichmäßige Schnitte herzustellen. Die Scheibe mit dem Präparat wurde in das Kryostat eingeführt und auch hier wurde ein besonderes Augenmerk auf die korrekte Platzierung gelegt. Nun erfolgte, bei Bregma + 3,14 mm beginnend, von rostral nach kaudal die Generierung der $12\text{ }\mu\text{m}$ starken koronaren Schnitte. Im Intervall von $500\text{ }\mu\text{m}$ wurde kryotomiert und je ein Querschnitt auf einen Objektträger (OT) aufgenommen. Dabei wurden in den Schnittebenen von 0 – $7500\text{ }\mu\text{m}$ sechzehn koronare Schnitte generiert. Die OT wurden getrocknet und in entsprechende Kästen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der durch das CCI erzeugte Schadensbereich befand sich zwischen Ebene 6 (Bregma + 0,64 mm) und Ebene 14 (Bregma – 3,36 mm). Zur Materialgewinnung von diesem Areal für die Ribonukleinsäure

(RNA)- und Proteinanalyse wurden Trimschnitte hergestellt. Dabei wurden ab Ebene 2500 bis Ebene 7500 4 x 60 µm dicke Schnitte generiert. Die einzelnen Schnitte wurden nun in korrekter anatomischer Position vorsichtig übereinandergelegt. So erhielt man einen 240 µm starken koronaren Gehirnschnitt. Mittels gekühlten Skalpells wurde zunächst das untere Drittel inklusive der Riechkolben abgetrennt, verworfen und der restliche Gehirnschnitt in vier Quadranten geteilt. Dabei wurde sowohl zwischen den ipsilateralen (rechten) und kontralateralen (linken) Hemisphären ein Schnitt vorgenommen, als auch zwischen den superioren (dorsalen) und inferioren (ventralen) Anteilen. Die Quadranten einer Seite wurden vorsichtig mit einer Nadel aufgenommen und in beschriftete, gekühlte Tubes transferiert. Diese wurden bei -80 °C bis zur molekularischen Verarbeitung konserviert.

5.3.5 Histologische Datenerhebung

5.3.5.1 Nissl-Färbung

Bei dieser in der Neurohistologie häufig angewandten Färbetechnik werden Zellkörper dargestellt. Der Farbstoff bindet nur an basophile Gruppen, die beispielsweise in Ribonukleinsäure (RNA) und in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) vorkommen und blau bzw. violett angefärbt werden. Bei den basischen Farbstoffen handelt es sich exemplarisch um Kresylviolett, Thionin oder Toulidinblau. Sowohl die RNA bzw. die Ribosomen und die DNA enthalten negativ geladene (basophile) Phosphatgruppen. Diese gehen Ionenverbindungen mit den basischen Farbstoffen ein, wobei es zu einer Darstellung der Zellkerne (DNA) sowie der Nucleoli (RNA) kommt. Am rauen ER (endoplasmatisches Retikulum) werden die großen Mengen an der Membranoberfläche enthaltenen Ribosomen ebenfalls angefärbt (225). Dabei kommt es zu einem dunkelblauen imponierenden Komplex, den man als Nissl Schollen bezeichnet. Axone und Dendriten, als Fortsätze der Nervenzellen, bleiben bei dieser Färbung

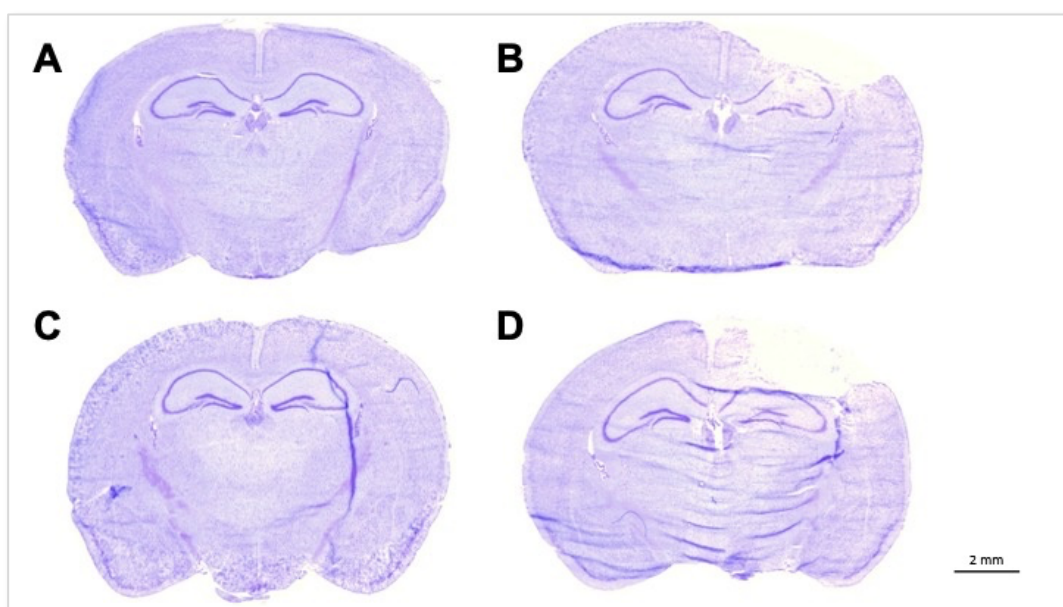


Abbildung 15: Repräsentative Darstellung der Gehirnschnitte nach Nissl-Färbung

fast transparent, da selektiv die Zellorganellen, die sich im Perikaryon befinden, angefärbt werden. Zudem enthalten sie kaum RNA bzw. DNA. Die OT wurden aus dem Gefrierschrank genommen und für eine Stunde bei RT getrocknet. Die Färbung mit Kresylviolett erfolgt nach standardisiertem Laborprotokoll mittels aufsteigender Alkoholreihe. Die Schnitte wurden für den Reinigungsvorgang für zwei Minuten in 70 % igem Ethanol fixiert. Dabei wurden Rückstände des überflüssigen Einbettungsmedium Neg-50 entfernt. Es folgte eine zehnmünütige Färbung der OT in einer Kresylviolettlösung (siehe *Kapitel 3.8 Herstellung von Lösungen*). Danach wurde der ungebundene Farbstoff mittels destilliertem Wasser von überschüssiger Farbe gereinigt. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Zur Entwässerung der Schnitte wurden diese zwei Mal kurzzeitig in 70 % Ethanol tingiert. Die OT wurden unterdessen zwei Mal in 96 %igem Ethanol sowie in 99,9 %igem Isopropylalkohol getaucht. Die Schnitte wurden nun für eine Dauer von fünf Minuten sowie zwei Minuten in Roti-Histol fixiert. Zuletzt wurden diese mittels Roti-Histokitt® eingeschlossen. Um die fixierten Gehirnschnitte mechanisch zu schützen, wurden diese mit einem Deckglas eingedeckelt und über Nacht getrocknet.

5.3.5.2 Quantifizierung des histologischen Schadensvolumens

Dabei wurden zur Quantifizierung des Schadens alle Schnittebenen nacheinander unter dem Lichtmikroskop dargestellt und vermessen. Hierzu wurde das gesamte Gehirnvolumen kontralateral (links, gesund), das Gehirnvolumen ipsilateral (rechts, geschädigt) und das gesunde Volumen rechts mit der Software Zen 2 (blue edition) ausgemessen. Dabei wurden die Gehirnhälften fotografiert, mittels der Software umfahren und deren Fläche berechnet. Die Kalkulierung des Schadensvolumens der gefärbten Hirnschnitte erfolgte nach standardisiertem Laborprotokoll. Aus den ermittelten Volumina lässt sich die Differenz bilden und damit das Läsionsvolumen jeder einzelnen Ebene bestimmen. Die Differenz der Gesamtfläche minus der Fläche des gesunden Gewebes bildet die Schadensfläche (A) in mm². Durch die Addition der Schadensfläche jeder Ebene multipliziert mit dem Abstand der Schnitte (500 µm = 0,5 mm) ergibt sich das Schadensvolumen (V_A) in mm³, nachzuvollziehen in folgender Formel:

$$V_A = (A_1 + A_2 + \dots + A_{16}) \times 0,5 \text{ mm}$$

Abbildung 16: Berechnung des Schadensvolumen (V_A) in mm³

5.3.5.3 Messung des Körnerzellbandes im Gyrus Dentatus

Das Ausmessen der Dicke des Körnerzellbandes (engl. Granular cell layer, GCL) im suprapyramidalen Blatt des Gyrus Dentatus kann zur Quantifizierung der Veränderungen im Bereich des Hippocampus herangezogen werden. Hierzu wurden drei vordefinierte Messbereiche (innen, mittig, außen) in den ipsilateralen und kontralateralen Hemisphären (Ebene 11 bis 13 (Bregma - 1,8 mm bis Bregma - 2,0 mm)) pro Tier verwendet. Der Mittelwert

wurde aus Messungen von je zwei Abschnitten eines Tieres gebildet. Somit wurde die Analyse als ipsilaterales und kontralaterales Verhältnis durchgeführt.

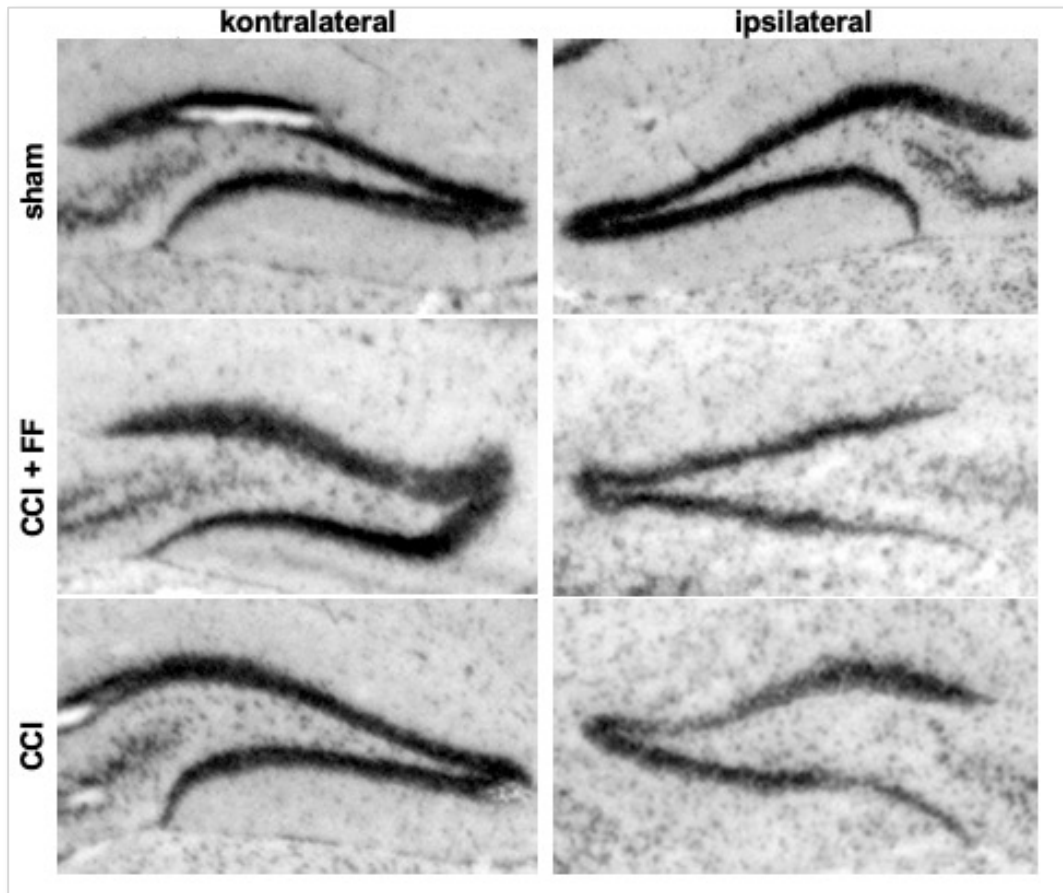


Abbildung 17: Repräsentative Darstellung des Körnerzellbandes

Abgebildet ist das ipsi- und kontralaterale Körnerzellband (GCL) des Gyrus dentatus im Hippocampus, exemplarisch von drei Studiengruppen Sham, CCI + FF und CCI, 5 Tage nach Trauma.

5.3.5.4 Immunhistochemische Färbungen

Die indirekte Fluoreszenzmarkierung von nachzuweisenden Proteinen auf (sub-) zellulärer Ebene ist das Prinzip, auf dem die Immunhistochemie beruht. Im ersten Schritt haften antigenspezifische Antikörper (AK), sog. primäre AK, an das Zielprotein, welche in einem zweiten Schritt mit einem fluoreszierenden Antikörper, dem sog. sekundärer AK, markiert werden. Durch Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge, lassen sich die Protein-AK-Komplexe sichtbar machen (226). In der vorliegenden Studie, wurden drei immunhistochemische Färbungen vorgenommen. Zum einen wird das saure Gliafaserprotein (*glial fibrillary acidic protein, GFAP*) als Marker für reaktive Astrozyten angefärbt. Zum anderen werden das *ionized calcium binding molecule 1 (Iba-1)* als Marker für Mikroglia gefärbt. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) wurde zur DNA-Färbung und damit als Zellkern-Marker verwendet. Bei Inflammation, Verletzung von Nerven und zerebralen Ischämien wird vor allem die mikrogliale Expression von Iba-1 hochreguliert (227). Das *Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1)* kann im Gehirn als Mikroglia-Marker verwendet werden, da es spezifisch in Mikroglia

und aktivierten Makrophagen exprimiert wird. Als Reaktion auf ein Schadensereignis findet ein Zustand einer reaktiven Astrogliose statt, d.h. Astrozyten gehen in einen reaktiven Zustand über und sind dabei hypertroph. Sie ändern ihre Morphologie und regulieren auf molekularer Ebene ihre Proteinexpression hoch. Daraus resultiert eine verstärkte GFAP-Immunfluoreszenz (127). Daher ist es wünschenswert, die Mikrogliazellen und Astrozyten mittels immunhistologischer Färbung in quantitativer Form zu erfassen und darzustellen. Ein standardisiertes laboreigenes Färbeprotokoll kam hierbei zum Einsatz. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Am ersten Tag wurden die bei -20 °C aufgehobenen Schnitte für 15 min auf einer 40 °C vorgewärmten Heizplatte aufgetaut und getrocknet. Die OT wurden zur weiteren Verarbeitung in Feuchtekammern aufgereiht, um einer Austrocknung der Schnitte entgegenzuwirken. Zur Nachfixation wurde mit einer Pipette 4 %iges Paraformaldehyd (PFA) auf die OT gegeben und dieses für 15 min inkubiert. Somit kommt es zu einer reversiblen Vernetzung der Proteine auf dem OT (228). Es folgen zwei Waschgänge a 5 min mit 0,01 M (molare Masse) PBST. Als nächsten Schritt folgt das Auftragen von 250 µl Blockierungslösung, bestehend aus 5 % normal goat serum (NGS), 0,5 % bovine serum (BSA) und 0,1 % Triton-X100 in PBS, deren benötigte Menge zuvor berechnet worden ist (siehe *Kapitel 4.8 Hergestellte Lösungen*). Auf jeden OT werden 250 µl pipettiert und diese mittels Parafilm abgedeckt. Die Inkubationszeit beläuft sich auf 30 Min. Es folgt die Verdünnung der zwei primären Antikörper Iba-1 und GFAP. Die Verdünnung der 1 µl des primären polyklonalen Anti-Iba-1-Rabbit-Antikörpers erfolgte mit 1 ml der oben genannten Blockierungslösung auf ein Verhältnis von 1 : 1000. Der primäre Anti-GFAP-Rabbit-Antikörper wird im Verhältnis 1 : 500 verdünnt. 250 µl dieses Gemischs werden auf jeden OT gegeben, mit einem Parafilm abgedeckt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Hierbei werden unspezifische Protein- und Ioneninterferenzen dezimiert und ungewünschte Färbungen minimiert. Am zweiten Tag erfolgte das Abwaschen der überflüssigen Antikörper mittels eines dreimaligen Waschganges mit PBS für jeweils 10 min. Die sekundären Antikörper, Goat-Anti-Rabbit-al568 und Goat-Anti-Rat-al488 wurden ebenfalls im Verhältnis 1 : 500 in der Blockierungslösung verdünnt. 250 µl des verdünnten, sekundären und fluoreszierenden Antikörpers werden auf die OT aufgetragen und bei Raumtemperatur für 1,5 h inkubiert. Wichtig ist hierbei die Abdunkelung der OT mittels Alufolie. Es folgen drei zehninütige Waschgänge in PBST, anschließend wurden diese mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Verdünnung 1 : 10.000) für 5 Minuten gefärbt. Dieses Reagenz färbt die Zellnuklei an, da es mit Doppelstrang DNA interkaliert (229). Die OT wurden erneut mit PBS gewaschen, dieser Vorgang wird wiederholt. Als letzter Schritt erfolgte das Eindeckeln mit Immu-Mount.

5.3.5.5 Quantifizierung der Immunhistofärbung

Die quantitative Auswertung der markierten Mikrogliazellen und Astrozyten erfolgte durch einen verblindeten Untersucher unter einem Axiovert-Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 488 und 568 Nanometer (nm). Mittels dieses konfokalen Mikroskops lässt sich das gefärbte Gewebe auf ipsi- und kontralateraler Seite des Schadens in 20-facher Vergrößerung untersuchen.

Die Mikrogliazellen, welche durch den Antikörper Iba-1 angefärbt wurden, leuchten grün auf. Die Astrozyten, angefärbt durch GFAP, stellten sich rot und die DAPI Kernfärbung blau dar. Für die Analyse wurden auf den Schnitten in Ebene 11 -

14 die Läsionsstelle aufgesucht. Das ausgewählte Areal grenzt unmittelbar kaudo-lateral an die CCI Läsion, liegt damit also periläsional und subkortikal. Im Anschluss wurde spiegelbildlich auf die kontralaterale Seite gewechselt und hier ebenfalls die Stelle aufgesucht und fotografiert. Der Interhemisphärenspalt stellt hierbei die Spiegelachse dar. Für die Auswertung wurden von den eingestellten Arealen Bilder erstellt und mittels der Software Image J die Größe des zu messenden Areals bestimmt (230).

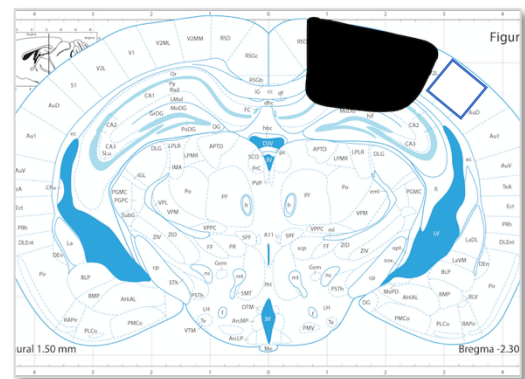


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Immunfluoreszenz Färbung

mit ROI (blauer Kasten) modifiziert nach Paxinos und Franklin (231).

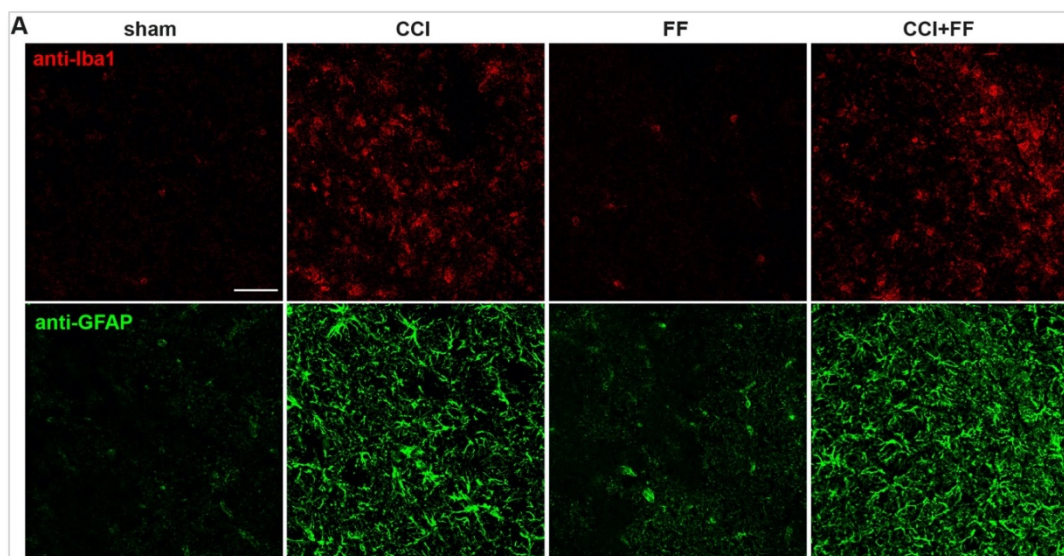


Abbildung 19: Repräsentative Darstellung der ipsi- und kontralateralen Immunfluoreszenzfärbung

abgebildet sind exemplarische Bilder der vier verschiedenen Studiengruppen, 5 Tage nach Trauma. Hier wird die periläsionale Hochregulation von GFAP und Iba-1 im Vergleich zu den korrespondierenden Regionen in FF und Sham dargestellt. 20 - fache Vergrößerung, Bregma: -2.00 mm. Maßstab: 50 μm .

Hierzu wurde die Partikelgröße jedes Zielproteins individuell festgelegt (DAPI: 5 - 1000 μm^2 , GFAP: 30 - 1000 μm^2 , Iba-1 30 - 1000 μm^2) und die positiv markierten Zellen, d.h.

beispielsweise die einzelnen Mikrogliazellen, ausgezählt. Pro Maus wurden für die Berechnung in diesem Verfahren drei Schnittebenen (Ebene 11 - 14) inkludiert. Anschließend wurde die Summe der vier Ebenen gebildet und daraus das arithmetische Mittel berechnet. Für eine vergleichbare Quantifizierung wurde die Zellzahl pro mm² angegeben.

5.3.6 Genexpressionsanalyse

5.3.6.1 Extraktion der Ribonukleinsäure

Im Zuge der Kryotomie erfolgte zwischen Ebene 6 bis Ebene 14 (Bregma + 0,64 bis -2,86 mm) die Herstellung von Trimschnitten (*s. Kapitel 5.3.4 Kryosektion und Probengewinnung*). Der Schadensbereich wurde in 64 koronaren Schnitten abgedeckt. Hierfür kam es zur seitengetrenten Gewinnung von 4 x 60 µm dicken Hirnquadranten, die bei -80 °C in Tubes aufbewahrt worden sind (232). Die RNA Extraktion wurde mittels des Rneasy Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt (233).

Dabei wurde sich an das laboreigene, standardisierte Protokoll gehalten. Grundsätzlich ist die RNA Extraktion aus den drei Schritten des Pufferns, des Trocknens und des Eluierens aufgebaut. Zunächst wurde das Tube, das die ipsilateralen Kryoschnitte der Ebene 2500, 3500, 4500, 5500 enthält, aus dem Tiefkühlschrank genommen und aufgetaut. Die einzelnen Tubes wurden jeweils mit 0,9 ml des vorbereiteten QIAzols lysiert und mit einer Edelstahlkugel im Homogenisator bei 20 Hertz (Hz) für zwei min homogenisiert. Zur Denaturierung der Proteine wurde dieses Gemisch für fünf Minuten bei RT inkubiert. Nun wurden 100 µl gDNA Eliminator zugegeben und dieses Gemisch wurde für 15 Sekunden mit einem Vortexer bei 2000 rpm vermischt. Der Vorgang wurde nach Zugabe von 180 µl Chloroform wiederholt. Es schließt sich eine Ruhephase von drei Minuten bei RT an. Zur Trennung der Phasen erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 15 Minuten bei 12.000 x g-Kraft (g). Es entstehen durch die Zugabe von Chloroform drei Phasen: eine RNA haltige, farblose (wässrige), eine DNA haltige, weiße Interphase sowie eine die Proteine enthaltene, rote, organische Phase. Die etwa 600 µl der oberen Phase wurden mittels Pipette vorsichtig in eine Minispinsäule transferiert, welche zuvor mit 600 µl von 70-prozentigen Ethanol befüllt worden sind. Dieses wurde bei RT für etwa 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Die RNA bindet hierbei selektiv an die Silicamebran der Säulen und wird aus der überschüssigen Flüssigkeit gelöst. Für die weitere Aufreinigung der RNA folgen zwei Waschvorgänge mittels vorbereiteten Puffer (*s. Kapitel 5.3.4 Kryosektion und Probengewinnung*). Für den ersten Waschschrift wurden 700 µl eines RWT Puffer in die Spinsäule gegeben und bei 8000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurde für den zweiten Waschschrift 500 µl RPE Puffer (verdünnt in Ethanol) auf die Säule pipettiert, ebenfalls bei 8000 x g für 15 Sekunden gewaschen. Die Überstände der Zentrifugation wurden verworfen. Der Schritt wurde wiederholt und zum Trocknen der Membran und Elimination möglicher Puffer- oder Ethanolreste bei 8000 x g für zwei Minuten zentrifugiert. Zum

Nachtrocknen wurde die Säule in ein frisches Tube gestellt und eine Minute bei 13.000 x g, der maximalen Zentrifugalkraft, zentrifugiert. In einem letzten Schritt folgte die Eluierung der RNA. 30 - 50 µl RNAfreies Wasser wurden mittig auf die Silicamembran der Spinsäule pipettiert und für eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Die endgültige Lagerung der RNA erfolgte in frischen, beschrifteten Tubes und bei -80 °C.

5.3.6.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Um die RNA Konzentration (C_{RNA}) im Eluat zu bestimmen, wurde 1 µl der gelöste RNA auf ein Photometer aufgetragen und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 Nanometer (nm), dem Absorptionsmaximum der RNA, gemessen. Das Photometer bestimmt die RNA Konzentration in µg / µl. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei einer Wellenlänge im ultravioletten Bereich von 280 nm. Durch die Bestimmung des Quotienten der Messungen bei 260 nm und 280 nm, lässt sich eine mögliche Kontamination mit Proteinen (Reinheitsgrad) bestimmen. Dieser Wert liegt idealerweise bei 1,8 - 2,1 (234). Eine Verunreinigung mit Proteinen oder aromatischen Substanzen zeigen Werte unterhalb dieses Bereiches an. Hierzu wurde folgende Formel genutzt:

$$\text{Reinheitsgrad} = \frac{\text{Messung bei 260 nm}}{\text{Messung bei 280 nm}}$$

Abbildung 20: Berechnung des Reinheitsgrades

5.3.6.3 Reverse Transkription

Da ein Nachweis von mRNA mittels qRT-PCR nicht möglich ist, wurde eine komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) hergestellt. Hierfür wurde durch ein enzymatisch wirksames Protein, die reverse Transkriptase, eine DNA-Kopie komplementär zu der RNA Sequenz erstellt. Die dazu benötigten Nukleotide befanden sich im Mastermix (235). Die cDNA wurde dann als Vorlage für die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) verwendet. Das QuantiTect® Reverse Transcription Kit von Qiagen und das miScript II RT Kit wurden für die Erzeugung der cDNA verwendet, dabei wurde sich an die Herstellerangaben gehalten (233). Alle Bearbeitungsschritte wurden auf Eis durchgeführt, um einem RNA-Abbau entgegenzuwirken. Da ein Rest genomischer DNA (gDNA) in der extrahierten RNA verbleiben kann, wurde dieser Rest über einen Puffer destruiert und eliminiert. Hierzu wurden zu jeder Probe 0,5 µg RNA und 2 µl gDNA Wipeout Puffer gegeben und dieses Gemisch mit RNase freiem Wasser auf 14 µl Volumen aufgefüllt. Es folgte das achtminütige Erhitzen auf 42 °C. Nun wurde im zweiten Schritt die cDNA mittels dem Enzym reverse Transkriptase synthetisiert. Als RNA-abhängige DNA-Polymerase bindet das Enzym über einen Primer an die RNA und nutzte diesen als Matrize für die Erzeugung des komplementären cDNA -Stranges. Die Erzeugung erfolgte als Hybrid am RNA Strang, welcher sich über eine Hydrolyse mittels dem Enzym RNase H separieren ließ. Hierzu wurde je eine Probe im Mastermix mit 1 µl Quantiscript Reverse

Transkriptase, 1 µl RT Primer Mix und 4 µl Quantiscript RT Puffer vermengt. Der Mastermix wird zur dDNA freien RNA Lösung hinzugegeben und inkubiert. Das Gemisch wurde für 30 min bei 42 °C inkubiert. Durch ein dreiminütiges Erhitzen auf 95 °C wurden die reversen Transkriptasen inaktiviert und die cDNA-Synthese gestoppt. Die neu synthetisierte cDNA wurde mit Wasser im Verhältnis 1 : 1 verdünnt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

5.3.6.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und qPCR

Seit den 90er Jahren ist die PCR in den in vitro Methoden die Vervielfältigungsmethode von DNA-Sequenzen der Wahl. Dabei fand pro Zyklus eine exponentielle Vermehrung (Amplifikation) des sog. Amplicons, eines ausgewählten DNA-Abschnitts, statt. Jedes Amplifikat diente als Vorlage für eine weitere polymerisierte komplementäre DNA-Kopie. Ein Zyklus wird in drei Abschnitte aufgeteilt und wurde automatisiert mithilfe von PCR-Blocks durchgeführt. Gebundene Primer, spezifische Oligonukleotidsequenzen, legen den zu vervielfältigenden Bereich selektiv fest. Die dabei verwendeten Primer bestehen aus 20 – 30 Nukleotideinheiten und stellen als komplementäre Sequenz den Startpunkt für die DNA-Polymerasen dar. Die komplementären DNA-Stränge wurden zwischen den Primerpaaren synthetisiert. Während der initialen Denaturierungsphase wurden die Wasserstoffbrücken, die zwischen der im Doppelstrang vorliegende DNA ausgebildet sind, auf 96 °C erhitzt und dabei denaturiert. So kam es zu einer Strangseparation. Damit es nicht zu erneuter Ausbildung der Doppelhelixstruktur kam, müssen die getrennten Stränge sofort auf 65 °C abgekühlt werden. In der Annealingphase erfolgte die Primerhybridisierung bei einer primerspezifischen Temperatur für eine Dauer von 30 s. Die Temperatur betrug meist 55 °C und richtet sich nach Sequenz und Länge des Primers. Nach der erfolgreichen Hybridisierung schloss sich die Elongationsphase an. Dabei bindete die DNA-Polymerase an den Startpunkt, das bedeutet an das 3' Ende des Primers und fügte die desoxygenierten Nukleotide dATP, dCTP, dTTP und dGTP komplementär zum abgelesenen Einzelstrang ein. Je nach Arbeitsoptimum der Polymerase und der damit verbundenen Polymerisation der komplementären Nukleotide war hiervoor ein erneutes Erhitzen des Thermocyclers auf 68 – 72 °C notwendig. Eine Erweiterung der bereits beschriebenen PCR bildete die schon 1992 entwickelte qPCR (236). Diese ermöglichte ebenfalls eine Vervielfältigung von Nukleinsäuren und zusätzlich dazu eine Quantifizierung in Echtzeit. Hybridisierungssonden oder fluoreszierende DNA-Farbstoffe, wie z.B. der Cyanin-Farbstoff SYBR-Green, interkalierten hierbei mit der DNA. Die Anregung erfolgte durch eine Lichtquelle. In einem weiteren Schritt wurde die Signalemission gemessen. Die gemessene Intensität korrelierte mit der Anzahl der DNA-Kopien. Somit wurde pro Zyklus ein Anstieg der markierten Amplifikate und eine proportionale Erhöhung des Fluoreszenzsignals verzeichnet. Die graphische Darstellung erfolgte gegen die Anzahl an PCR

Durchläufen, welche durch die entstehende Kurve einen Rückschluss auf die Menge der PCR Produkte erlaubte.

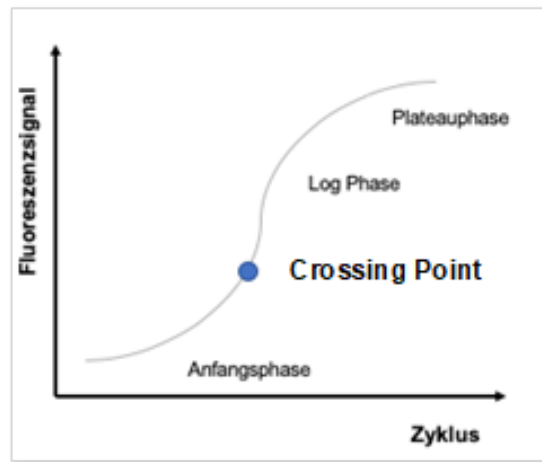


Abbildung 21: Amplifikationskurve einer qPCR

Darstellung des gemessenen Fluoreszenzsignals gegen die Zyklusanzahl mit Anfangsphase, einer exponentiellen log-Phase und einer Plateauphase.

Da die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Polymerase und Primer treffen, relativ gering war, verlief auch der erste Teil der Kurve relativ flach. Im mittleren Bereich ist die Arbeitstemperatur, das Verhältnis von Primern, Polymerase, Substraten und Templates ideal. Somit repräsentierte das steigende Fluoreszenzsignal die optimalen Bedingungen und hieraus resultierte ein exponentiell verlaufender Kurvenanteil. Der Bereich, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant höher war als die Hintergrundfluoreszenz, wurde über den *cycle threshold*-Wert (Schwellenwertzyklus) oder *crossing point*-Wert (Kreuzpunkt) als Beginn der exponentiellen Phase bestimmt. Die dritte Phase mit einem konstant hohen Fluoreszenzsignal verlief plateauartig. Die Menge an Produkten war hoch. Somit hybridisieren einzelne Fragmente und Substrate wurden aufgebraucht. Durch die hohe Temperatur erfolgte ein Destruieren der Nukleotide und Polymerasen. Eine zuvor erstellte Standardkurve half, die Effizienz einer PCR Reaktion zu beurteilen. Hierzu erfolgte die Untersuchung einer Verdünnungsreihe (z.B. 1 : 1, 1 : 4 etc.) einer Standardlösung mit bekannter cDNA Konzentration. Diese Kurve wurde graphisch aufgetragen und so die Steigung der Standardkurve ermittelt und die Effizienz bestimmt. Eine Verdoppelung der PCR Produkte pro Zyklus bedeutete eine optimale Effizienz. Für jedes Ziel- und Referenzgen erfolgte die Ermittlung der Effizienz. Eine Normalisierung über einen Abgleich der Expressionswerte von Haushaltsgenen (engl. Housekeeping Genes) erfolgte für die relative Quantifizierung der Zielgene. Dabei hat sich in vergleichbaren Studien die Peptidylpropyl Isomerase A (PPIA) als Housekeeping-Gen durchgesetzt (237). Dessen Expression veränderte sich nach einem SHT nicht, wurde somit also konstant und unabhängig von der zugrundeliegenden Intervention exprimiert. Mit Hilfe des LightCyclers® 480 System und der LightCycler® 480 Software wurde die Detektion sowie die Amplifikation durchgeführt. Die qRT-PCR wurde zur Überprüfung für

folgende Zielstrukturen/Targets in jeweils doppelter Ausführung hergestellt: GFAP, *mul1b*, SPP1 (OPN), *mGRN*, C2, C3, *Mrc1*, C1QA, FOS, $TNF\alpha$, sowie das Housekeeping-Gen PPIA. Das nach genannte Pipettierschema wurde für die Herstellung der Proben für die qRT-PCR verwendet. Die hierfür verwendenden Kits, Sonden und Primer finden sich in bereits veröffentlichten Studien und in der Materialauflistung (238). Mitglieder der Forschungsgruppe führten diese Untersuchungen durch.

Tabelle 12: Pipettierschema für PCR

SYBR-Green	Hybridisierungssonde
5 µl SYBR-Green	5 µl Kit-spezifischer Mastermix
0,25 µl Primer F bzw. S	0,25 µl Primer F bzw. S
0,25 µl Primer R bzw. A	0,25 µl Primer R bzw. A
3,5 µl H ₂ O	0,5 µl FL-Sonde
1 µl Target DNA	0,5 µl Cy5-Sonde
	2,5 µl H ₂ O
	1 µl Target DNA

5.3.7 Immunoblot

5.3.7.1 SDS Page

Die SDS-Page Methode wurde zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe angewandt. Hierbei wurde Natriumdodecylsulfat (SDS) als Ladepuffer eingesetzt. Dieses spaltete die Proteine in ihre Untereinheiten sowie β -Mercaptoethanol, welches die Disulfidbrücken löste. Die SDS-Protein-Komplexe sind negativ geladen und wanderten dementsprechend zur Anode. Es wurde ein einheitliches Masse- und Ladungsverhältnis aufrecht gehalten und die Trennung der Proteine erfolgte nur nach ihrer Ladung, nicht nach der Größe. Das SDS Gel bestand aus zwei Komponenten, dem Sammelgel, in welchem die Proteine gestapelt wurden und aus dem Trenngel, das kleine Poren für die größengerechte Trennung aufweiste. Die Gellösung bestand aus Acrylamid, dem Radikalbildner Ammoniumpersulfat (APS) und dem Polymerisationskatalysator Tetramethylethylamin. 20 µg Protein wurden in einem Verhältnis von 1 : 6 mit dem SDS-Ladepuffer gemischt und bei 95 °C für eine Dauer von fünf min inkubiert. Es folgte die Beladung der Taschen. Für diese wurde das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt, welche mit einer Spannung von 0,02 Ampere geladen war und so die Wanderung der Proteine zur Anode ermöglichte.

5.3.7.2 Western Blot

Die Auftrennung der Proteine der Größe nach erfolgte mittels SDS-Page. Der Western Blot hat der Detektion von spezifischen Proteinen gedient. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben auf den Gehalt von Spektrin und GFAP untersucht. Hierfür wurden die Proteine mittels

eines weiteren elektrischen Feldes von dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. An diesem blieben die Proteine aufgrund ihrer hydrophoben Wechselwirkungen haften und können nun mittels spezifischer Antikörper detektiert werden. Die Zusammensetzung hierfür stellt sie wie folgt dar:

Kathode – 2 x Filterpapier – Nitrozellulosemembran – SDS-Gel – 2x Filterpapier - Anode

Der Proteintransfer erfolgte bei 380 Milliampere (mA) über eine Dauer von 80 min. Mittels in TBST gelöster 2,5 % Magermilch wurden freie Bindungsstellen der Membran blockiert. Dies wurde für eine Stunde inkubiert. Als nächster Schritt erfolgten die Fixierung und die nächtliche Inkubation bei 4 °C des ersten Antikörpers. Nach einem zweimaligen, zehnmütigen Waschen in TBST wurde der zweite Antikörper für eine Stunde bei RT fixiert. Dem folgte ein letzter zehnmütiger Waschgang in TBST. Mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät, einem computergestütztem Detektionsverfahren, erfolgte die Proteindetektion. Die Auswertung der Intensität und die Quantifizierung der jeweiligen Proteinbanden im Vergleich zu der Bande des Kontrollproteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) erfolgte mit der Software ImageJ.

5.3.8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Beim ELISA wird ein Antigen auf einer festen Oberfläche immobilisiert und durch einen enzymgekoppelten Antikörper detektiert. Somit sind der Nachweis und die Quantifizierung von Antigenen (Proteinen) in Gemischen, in unserem Fall aus dem Plasma, möglich (239). Für die Untersuchung der im Plasma enthaltene Proteine wurde das gewonnene Blut mit Heparin versetzt, zentrifugiert und eingefroren (siehe *Kapitel 5.3.3 Euthanasie und Präparation*). Anschließend wurden die Mausplasmaproben 1 : 200-fach verdünnt. Danach wurden die Herstellerangaben und die Anleitung des Quantikine ELISA Mouse Osteopontin (OPN) und Progranulin (PGRN) Immunoassays befolgt und die Proben analysiert. Zuletzt erfolgte die Bestimmung der Extinktion bei 450 nm mittels eines Mikroplattenlesegeräts. Die Osteopontin und Progranulinkonzentrationen wurden als ng / ml ausgedrückt.

5.4 Statistische Auswertung der Daten

Die Nutzung der Software GraphPad-Prism (Version 8) erfolgt für die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse. Das Signifikanzniveau wird für alle Berechnungen kleiner als 5 % (p -Wert $< 0,05$) festgelegt. Ausreißer wurden mittels Rout-Test ermittelt und von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Der Shapiro-Wilk-Normalitätstest sowie die Quantil-Quantil Diagramme (*engl. QQ-plot*) wurden für die Analyse der (nicht-)parametrischen Verteilung der Daten verwendet. Der Student's-t-Test (ungepaarter t-Test) wird für die Vergleiche von normalverteilten Daten zwischen zwei Gruppen benutzt, der Mann-Whitney-U-test hingegen für nicht-normalverteilte Daten. Die einfaktorielle oder zweifaktorielle Varianzanalyse (*engl. One-way or two-way analysis of variance, ANOVA*) wurde für die Vergleiche normalverteilter Daten von mehreren Gruppen verwendet. Der Holm-Sidak's *post hoc* - oder der Tukey's multiple comparison Test wurde für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten bzw. mehreren Zeitpunkten herangezogen (Bsp. spezifische Verhaltenstests, Körpergewichtsmessungen). Die Darstellung der Daten erfolgt als Mittelwerte (MW) plus/minus (+/-) Standardfehler (SEM) unter Berücksichtigung verschiedener Signifikanzniveaus: $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,0001$.

6 Ergebnisse

6.1 Verhaltensbiologische Testung

6.1.1 Neurological Severity Score - Die Kombination von Schädelhirntrauma und Femurfraktur hat einen Effekt auf die neuromotorische Beeinträchtigung der Versuchstiere

Zunächst wurden die Ergebnisse des Neurological Severity Scores (NSS) betrachtet. Diese geben Aufschluss über neuromotorische Fähigkeiten und deren Defizite. Das Ergebnis der Erhebung des NSS zu den Zeitpunkten präoperativ (*preop.*), erster postoperativer Tag (*d1*), dritter postoperativer (*d3*) und fünfter postoperativer Tag (*d5*) wird im Folgenden graphisch dargestellt. Dieser umfasst einen Punktwert von 0 - 13 Punkte.

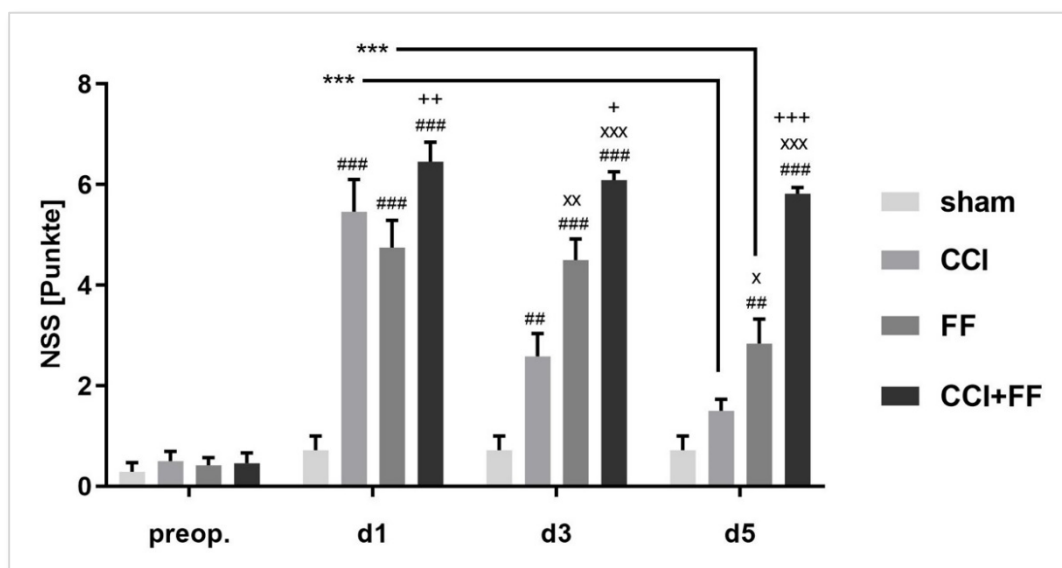


Diagramm 1: Ergebnisse des Neurological Severity Scores

Eine Kombination von SHT und Femurfraktur hat einen Effekt auf die neuromotorische Beeinträchtigung der Versuchstiere. Das Säulendiagramm zeigt die Punktzahl des NSS zu den Zeitpunkten präoperativ, 24 h, 72 h und 120 h nach einem gesetzten CCI (n=12), FF (n=12) oder CCI + FF (n=11) Trauma. CCI Mäuse zeigen einen erhöhten NSS an Tag 1 und Tag 3 im Vergleich zu den Sham-Tieren (n=7) und erholen sich bis Tag 5 fast vollständig. Die FF-Tiere zeigen ein höheres Defizit im Vergleich zu den Sham-Tieren und erholen sich ebenfalls zwischen Tag 1 und Tag 5. CCI + FF Mäuse zeigen einen erhöhten NSS und es ist keine Regredienz ihres Defizits innerhalb des Beobachtungszeitraumes zu sehen. Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW +/- SEM. Two-way ANOVA Test, p-Werte ermittelt mittels Tukey's multiple comparison test (# signifikant zu Sham (# signifikant zu Sham (# p<0,05; ## p<0,01, ### p<0,0001); + signifikant zu FF (+ p<0,05; ++ p<0,01, +++ p<0,0001); x signifikant zu CCI (x p<0,05; xx p<0,01, xxx p<0,0001)). *p<0,05.

6.1.1.1 NSS nach 24 Stunden

Im präoperativ erhobenen NSS erreichten die Versuchstiere gruppenübergreifend maximal einen Wert von 1 - 2 Punkten. 24 h nach der operativen Phase zeigten alle Mäuse der Interventionsgruppen (CCI, FF, CCI + FF) eine deutliche Beeinträchtigung im neurologisch-koordinativen Bereich im Vergleich zu den Sham-Tieren. Der Anstieg des NSS der CCI, FF und CCI + FF-Gruppe sind dabei signifikant zur Sham-Gruppe (p<0,0001). In der Sham-

Gruppe stieg der NSS auf einen MW von $0,71 \pm 0,29$ Punkte an. Der NSS der FF Gruppe stieg von einem Punktniveau von 0,42 auf einen MW von $4,75 \pm 0,54$ Punkten. Die CCI-Gruppe zeigte einen ähnlichen hohen Anstieg auf einen MW von $5,46 \pm 0,64$ Punkte. Den steilsten Anstieg hatte die Gruppe der kombinierten FF + CCI zu verzeichnen, dieser stieg bis auf ein Maximum von 8 Punkten an, mit einem MW von $6,46 \pm 0,39$ Punkten. Zudem ist der Anstieg der CCI + FF-Gruppe signifikant zur Gruppe der FF ($p=0,0058$).

6.1.1.2 NSS nach 72 Stunden

Die Werte der Sham-Gruppe bleiben über die postoperative Beobachtungsdauer von 5 Tagen annähernd konstant. Der NSS der CCI Gruppe zeigte am dritten postoperativen Tag eine Regredienz der neurologischen Beeinträchtigung von einem Punktniveau von $5,46 \pm 0,64$ Punkten auf $2,58 \pm 0,45$ Punkte. Der NSS der FF bleibt an Tag 3 auf einem annähernd konstanten Level von $4,5 \pm 0,42$ Punkten. Auch der NSS der CCI + FF Tiere hielt in etwa sein Niveau bei 6 ± 0 Punkten. Im Vergleich der Interventionsgruppe FF und CCI + FF mit der Sham-Gruppe konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p<0,0001$). Auch der Vergleich der Sham-Gruppe mit den CCI Tieren lieferte signifikante Ergebnisse ($p=0,0086$). Die Ergebnisse der FF ($p=0,001$) als auch der CCI + FF-Gruppe ($p<0,0001$) sind signifikant zu CCI. Zudem ist der Anstieg der CCI + FF-Gruppe signifikant zur Gruppe der FF-Tiere ($p=0,0116$). Somit zeigen die Tiere der Polytrauma Gruppe an Tag 3 schwerwiegendere Defizite im Vergleich zu den Mäusen, die ein einzelnes Trauma (CCI oder FF) erhalten haben.

6.1.1.3 NSS nach 120 Stunden

Der NSS der CCI Gruppe fällt weiter, nun auf ein Punktniveau von $1,5 \pm 0,23$ Punkte. Somit setzt sich der Trend der Regeneration der CCI Tiere 120 Stunden nach Intervention fort. Ebenfalls zeigte die FF-Gruppe eine Regredienz auf ein Niveau von $2,83 \pm 0,49$ Punkten. Die CCI-Tiere zeigten eine signifikante Verbesserung des Zustandes von Tag 1 zu Tag 5 ($p=0,0003$). Die neurologische und koordinative Beeinträchtigung der CCI + FF Gruppe bleibt weiterhin konstant auf 6 ± 0 Punkten. Die Ergebnisse sind auch hier als signifikant zu betrachten und die beobachteten Unterschiede zwischen den Gruppen (Sham vs. FF ($p=0,0021$), CCI vs. FF ($p=0,0413$), CCI, Sham und FF vs. FF + CCI ($p<0,0001$)) werden an Tag fünf beibehalten ($p<0,01$ und $p<0,0001$).

6.1.2 Beinbelastungsscore

Die neurologische Beurteilung basiert mitunter auf der Erhebung der motorischen Funktion der Extremitäten. Um die durch die Femurfraktur verursachten Beeinträchtigungen abzugrenzen, wurde ein Beinbelastungstest (BSS, 0 - 6 Punkte) in den Gruppen FF und FF + CCI zu drei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der Beweglichkeit sowie der physischen Belastbarkeit der unteren Extremität. Die FF-Gruppe erreicht 24h nach dem Trauma durchschnittlich $1,79 \pm 0,23$ Punkte. Hingegen fällt der BSS der CCI + FF-Gruppe höher aus, auf einen Mittelwert von $2,82 \pm 0,27$ Punkte. 72 h nach dem Trauma erreicht die FF-Gruppe einen MW von 2 ± 0 Punkte, dagegen liegt der BSS der CCI + FF Gruppe weiterhin höher, bei $2,2 \pm 0,12$ Punkte. Beide Gruppen zeigen nach 120 h eine Regredienz, zu dem Zeitpunkt hat die FF Gruppe einen durchschnittlichen BSS von $1,38 \pm 0,22$ Punkte, für die CCI+FF Gruppe lässt sich ein MW von 2 ± 0 Punkte ermitteln. Die Unterschiede waren im Vergleich innerhalb der Gruppen nur an Tag 1 signifikant ($p=0,0262$). Die CCI + FF Gruppe wies eine signifikante Verbesserung der Beinbelastung von Tag 1 auf Tag 5 ($p=0,0012$) und von Tag 3 auf Tag 5 ($p=0,0368$) auf. Dieser Effekt war bei Tieren mit einer isolierten FF nicht nachweisbar.

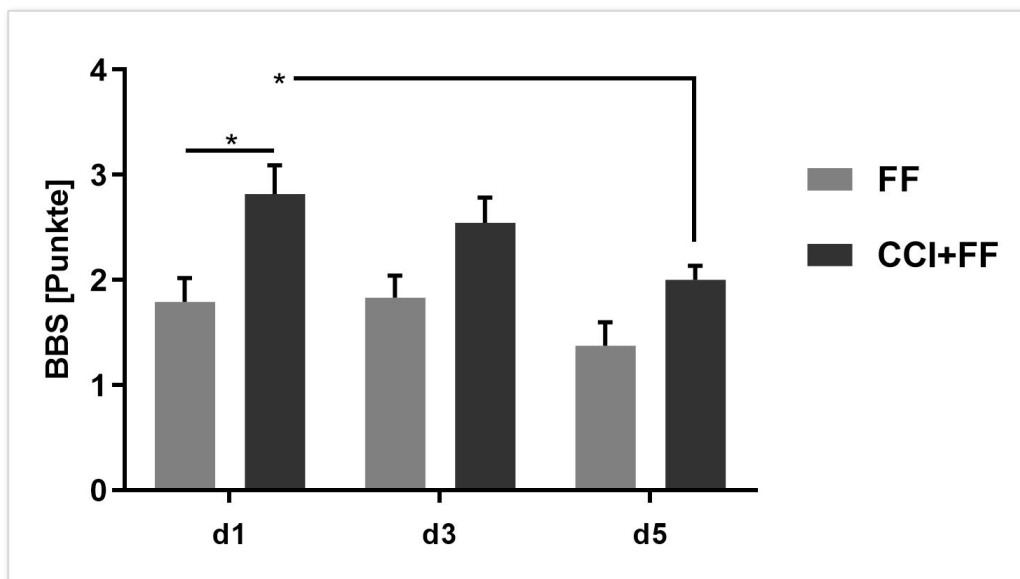


Diagramm 2: Ergebnisse des Beinbelastungsscore (BSS)

CCI + FF Mäuse zeigen einen höheren BSS-Score an Tag 1 und eine signifikante Verbesserung der Beinbelastung an Tag 5, im Vergleich zu den FF-Tieren. Darstellung zu drei verschiedenen Zeitpunkten Tag 1, Tag 3 und Tag 5 der Gruppen FF (n=12) und FF + CCI (n=11) in Punkten. Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW +/- SEM. Two-way ANOVA mit Tukey's multiple comparison Test.

6.1.3 Auswertung des Open Field Tests

Um weitere Auswirkungen der Interventionen des CCI und / oder der FF genauer zu analysieren, wurden im open field Test (OFT) allgemeine Bewegungskriterien (d.h. die gesamte zurückgelegte Strecke in m und die mittlere Geschwindigkeit in cm / s) bewertet.

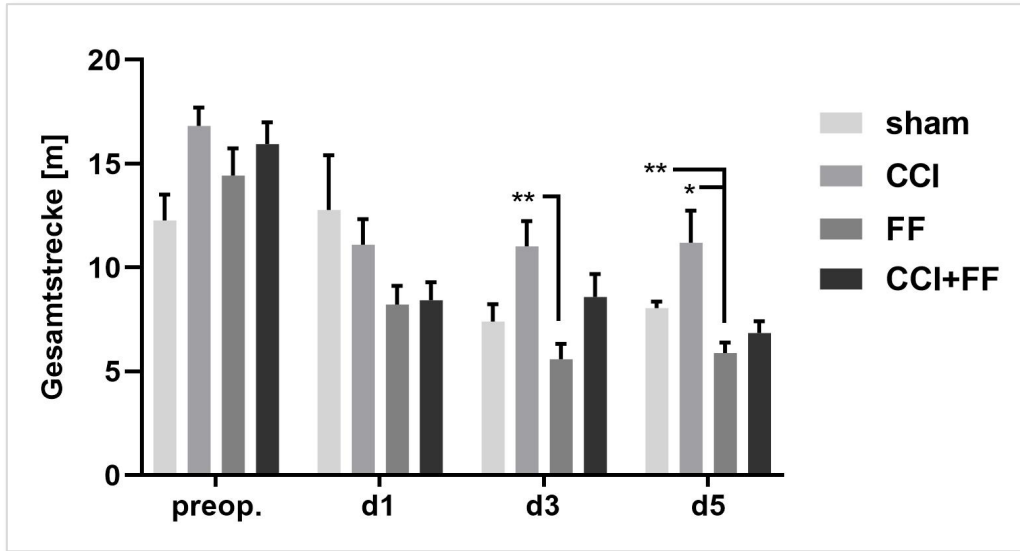


Diagramm 3: Darstellung der zurückgelegten Strecke

Keine signifikante Beeinträchtigung der zurückgelegten Strecke der verschiedenen Versuchsgruppen (Sham n=7, CCI n=12, FF n=12, CCI + FF n=11). Zurückgelegte Strecke aller Gruppen zum Zeitpunkt preop, Tag 1, Tag 3 und Tag 5 nach Trauma. Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW +/- SEM. Mixed-effects analysis. P-Werte wurden mit Tukey's multiple comparison test berechnet.

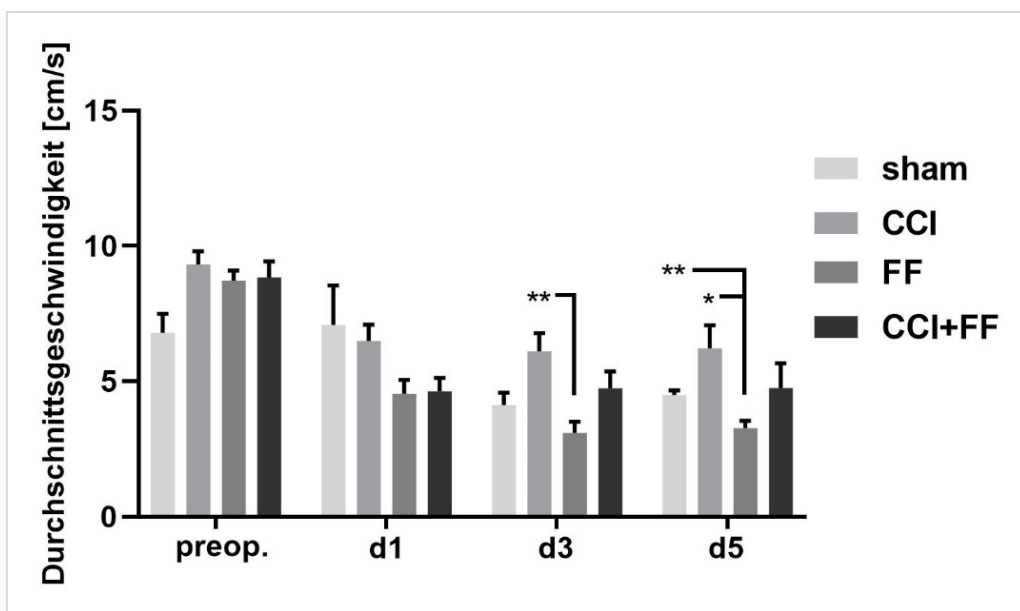


Diagramm 4: Darstellung der Durchschnittsgeschwindigkeit

Es ist keine signifikante Beeinträchtigung der Durchschnittsgeschwindigkeiten der verschiedenen Versuchsgruppen (Sham n=7, CCI n=12, FF n=12, CCI + FF n=11) festzustellen. Durchschnittsgeschwindigkeit in cm/s aller Gruppen zum Zeitpunkt preop, Tag 1, Tag 3 und Tag 5 nach Trauma. Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW +/- SEM Mixed-effects analysis. P-Werte wurden mit Tukey's multiple comparison test berechnet.

Die CCI + FF Tiere zeigten bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes an Tag 5 keine Beeinträchtigung im Vergleich zu allen anderen Studiengruppen. Zusätzlich wurde das Angstverhalten der Versuchstiere betrachtet. Hierzu wurde quantitativ erfasst, wie häufig sich das Versuchstier in einem gewissen Zeitraum im OFT aufstellte (*engl. rearing*), sich mit zur Hilfenahme eines Gegenstandes, beispielsweise der Wand, aufstellte (*engl. supported rearing*) oder sich streckte (*engl. stretch-attend postures (SAP)*).

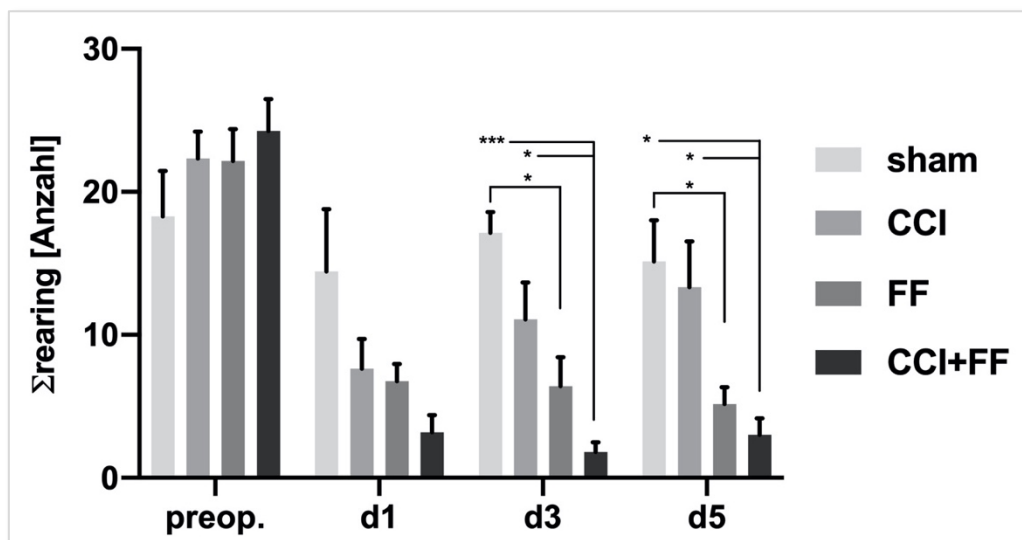


Diagramm 5: Ergebnisse der Aufstellversuche (rearing + supported rearing)

Signifikante Verringerung der Anzahl der Aufstellversuche (rearing) in der CCI + FF sowie in der FF-Gruppe. Darstellung der Summe der Aufstellversuche auf die hintere Extremität in allen Vergleichsgruppen (Sham n=7, CCI n=12, FF n=12, CCI + FF n=11) zu vier unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten. Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW +/- SEM. Mixed-effects analysis, p-Werte wurden mit Tukey's multiple comparison test berechnet.

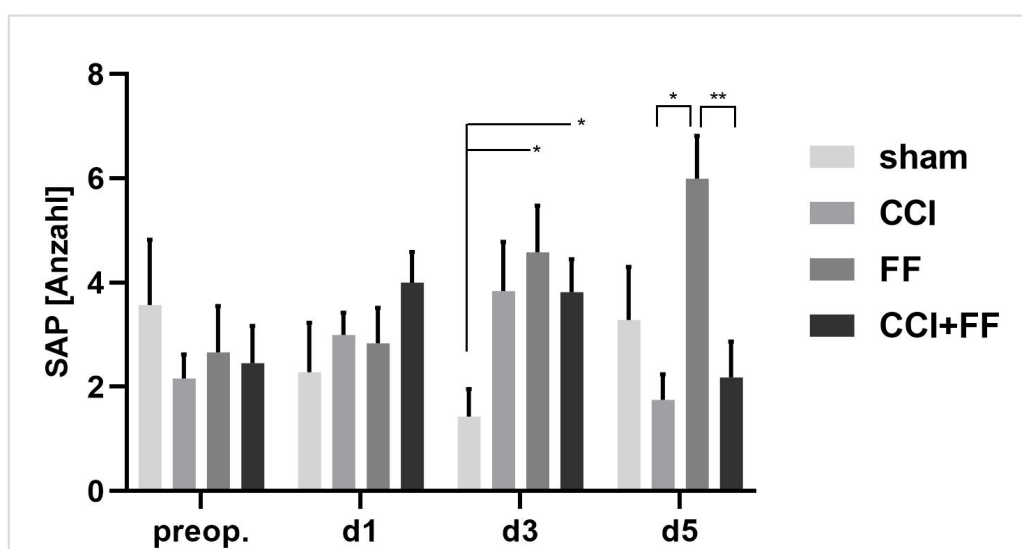


Diagramm 6: Ergebnisse der SAP-Frequenz

Signifikante Erhöhung der SAP-Frequenz bei den FF-Mäusen im Vergleich zu den Sham Tieren an Tag 5. Darstellung der Summe der SAP (stretch-attend postures) Frequenz in allen Vergleichsgruppen (Sham n=7, CCI n=12, FF n=12, CCI + FF n=11) zu vier unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten. Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW +/- SEM. Mixed-effects analysis, p-Werte wurden mit Tukey's multiple comparison Test berechnet.

Häufigeres Aufstellen sowie SAP werden mit einem stärker ausgeprägtem Angstverhalten in Verbindung gebracht (s. *Kapitel 5.3.2 Neurologische Testung*) (223, 224). Es zeigte sich ein vermindertes Aufstellen auf die hintere Extremität in der CCI + FF und FF-Gruppe, jedoch eine erhöhte SAP-Frequenz bei den FF-Mäusen im Vergleich zu den Sham Tieren an Tag 5. Da die Femurfraktur das Aufstellen der Versuchstiere auf die hintere Extremität verhindern kann und so die Ergebnisse beeinflusst werden könnten, wurden die Daten des Aufstellens sowie die SAP-Daten zum AEB (*engl. anxiety expression behavior*) zusammengefasst. Hierbei zeigten CCI + FF-Tiere im Vergleich zu allen anderen Studiengruppen an Tag 5 signifikant verringertes AEB (Sham vs. FF + CCI $p=0,0035$, CCI vs. FF + CCI $p=0,033$, FF vs. FF + CCI $p=0,019$). Alle Tiere der Interventionsgruppen (CCI, FF, CCI + FF) demonstrieren einen verringerten AEB an Tag 1, 3 und 5 im Vergleich zu den präoperativen Werten.

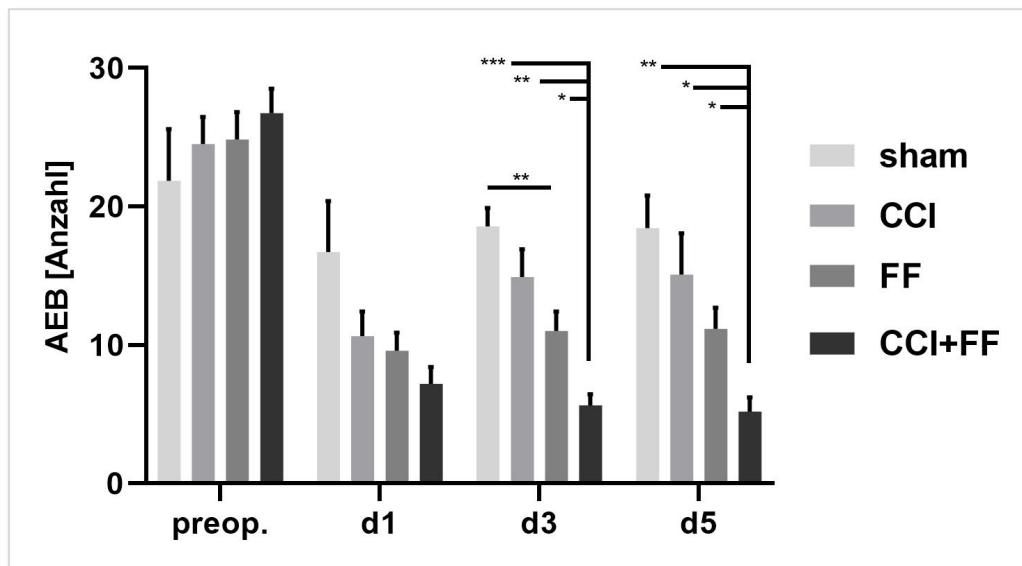


Diagramm 7: Ergebnisse des AEBs

CCI + FF Tiere zeigen ein signifikant vermindertes AEB im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen an Tag 3 und Tag 5. Alle Versuchsgruppen zeigten ein vermindertes AEB an Tag 1, 3 und 5 im Vergleich zu den präoperativ erhobenen Werten, dieser Vergleich ist hier nicht dargestellt. Darstellung des Angstverhaltens der Versuchstiere (Sham $n=7$, CCI $n=12$, FF $n=12$, CCI + FF $n=11$) als anxiety expression behavior (AEB) zu vier verschiedenen Zeitpunkten. Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW +/- SEM. Mixed-effects analysis sowie one-way ANOVA Test p-Wert Ermittlung mittels Holm-Sidak's multiple comparison test. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

6.1.4 Auswertung des Körpergewichtes

Die Nahrungsaufnahme und die Ermittlung des Körpergewichts lassen Rückschlüsse auf das Wohlergehen der Versuchstiere zu. Aus diesem Grund erfolgte zur gleichen Tageszeit ein tägliches Wiegen. Man geht davon aus, dass die Nahrungsaufnahme gesunder Mäuse nicht beeinträchtigt wird. Diese können ihr Gewicht über den Beobachtungszeitraum konstant halten, wohingegen Mäuse, die unter körperlichen Stress leiden, eine abnorme Gewichtsentwicklung zeigen können. In der vorliegenden Studie wurde das Körpergewicht in allen Gruppen an Tag 1 im Vergleich zu den Daten von vor der Operation signifikant durch die

vorgenommenen chirurgischen Eingriffe beeinflusst (CCI, FF, FF + CCI mit $p < 0,0001$, Sham $p = 0,0006$). Die Mäuse regenerierten sich 72 h nach dem Trauma wieder. Es konnte keine signifikante Körpergewichtsänderung innerhalb der Gruppen über die Zeit festgestellt werden.

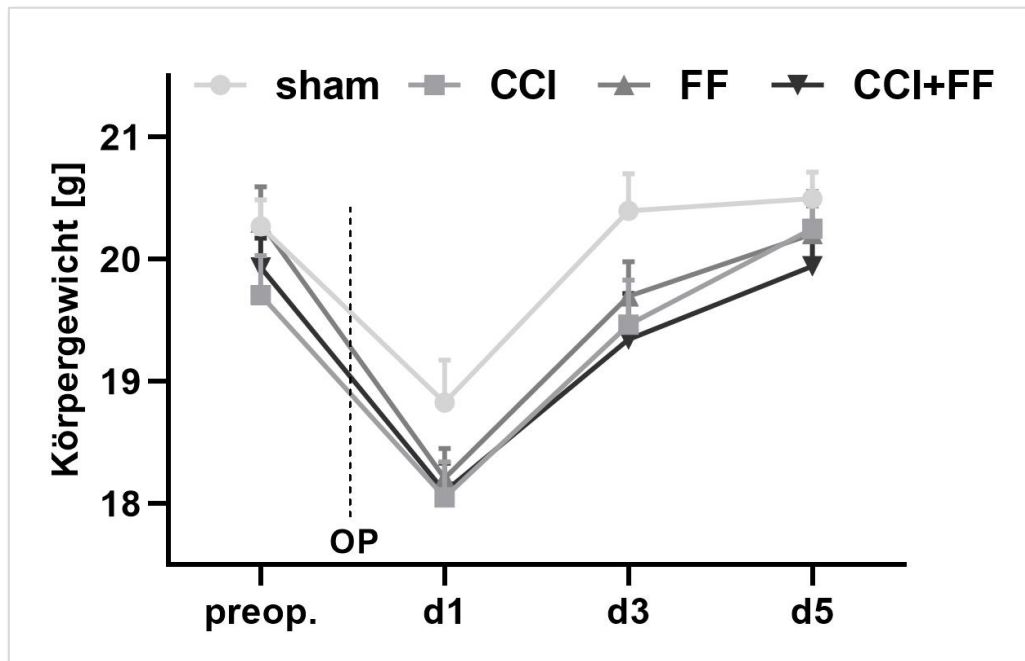


Diagramm 8: Ergebnisse des Körpergewichts

Signifikante Veränderung des Körpergewichts von Tag 1 vs. preop in allen Versuchsgruppen über den Beobachtungszeitraum von 5 Tagen. Keine signifikante Veränderung an den jeweiligen Untersuchungstagen zwischen den Gruppen über den Zeitraum von 5 Tagen. Darstellung des Körpergewichts in g zu vier verschiedenen Zeitpunkten preop, Tag 1, Tag 3 und Tag 5 der vier Beobachtungsgruppen (Sham $n=7$, CCI $n=12$, FF $n=12$, CCI + FF $n=11$). Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW \pm SEM. Two-way ANOVA und mit p-Wert Bestimmung mittels Tukey's multiple comparison test.

6.2 Histologische Färbungen

6.2.1 Auswertung des Schadensvolumens

Die Schadensbereiche der nach Nissl gefärbten Gehirnschnitte wurden auf die o.g. Weise ausgewertet. Hierfür wurde das Läsionsvolumen nach 5 Tagen bestimmt. Dieses umfasst eine kortikale und subkortikale Region sowie Anteile des dorsalen Hippocampus. Das Läsionsvolumen wurde als Anteil in Prozent der Läsion in der ipsilateralen Hemisphäre graphisch dargestellt (s. Diagramm 9). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied des Läsionsvolumens der Mäuse mit einer einzelnen CCI Verletzung oder einer kombinierten Verletzung aus FF und CCI festgestellt werden.

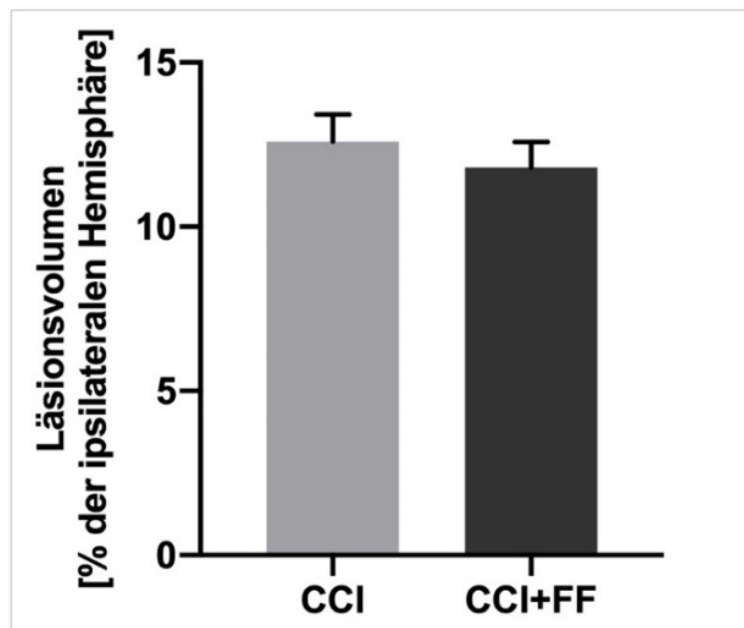


Diagramm 9: Ergebnisse des Läsionsvolumens

Es war kein signifikanter Unterschied des Läsionsvolumens zwischen der CCI und der CCI + FF Gruppe festzustellen ($p=0,497$). Das Säulendiagramm zeigt das Läsionsvolumen der CCI- ($n=12$) und CCI + FF- ($n=11$) Gruppen dargestellt als Prozentsatz der ipsilateralen Hemisphäre. Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW +/- SEM. MW und SEM in Kubikmillimeter (mm^3) abgebildet. P-Wert mittels Student t-test berechnet.

6.2.2 Auswertung der Gyrus Dentatus Messung

Zusätzliche Messungen wurden durchgeführt, um auch an anderen Orten den Hirnschaden untersuchen und quantifizieren zu können. Hierzu wurde eine Breitenmessung im Körnerzellband (*engl. granular cell layer, GCL*) im suprapyramidalen Blatt des Gyrus dentatus im Hippocampus vorgenommen. Dabei wurde eine Berechnung der Breitenverhältnisse des ipsi- und kontralateralen Körnerzellbandes durchgeführt, wobei ein erhöhter Substanzverlust in dieser speziellen Hippocampusregion festgestellt werden konnte. Wie in Diagramm 10 dargestellt, ist die Dicke der GCL-Schicht der CCI- als auch der CCI + FF-Tiere gegenüber der Sham- sowie der FF-Gruppe signifikant verringert (für alle $p < 0,0001$). Dieses kann in einen Zusammenhang mit einem ipsilateralen, posttraumatischen Substanzverlust nach CCI gebracht werden. Eine zusätzliche Verletzung, wie die in der vorliegenden Studie durchgeführte FF, führt zu einer Zunahme dieses Substanzverlustes. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der CCI + FF-Gruppe im Vergleich zum isolierten CCI-Trauma festgestellt werden ($p < 0,0377$).

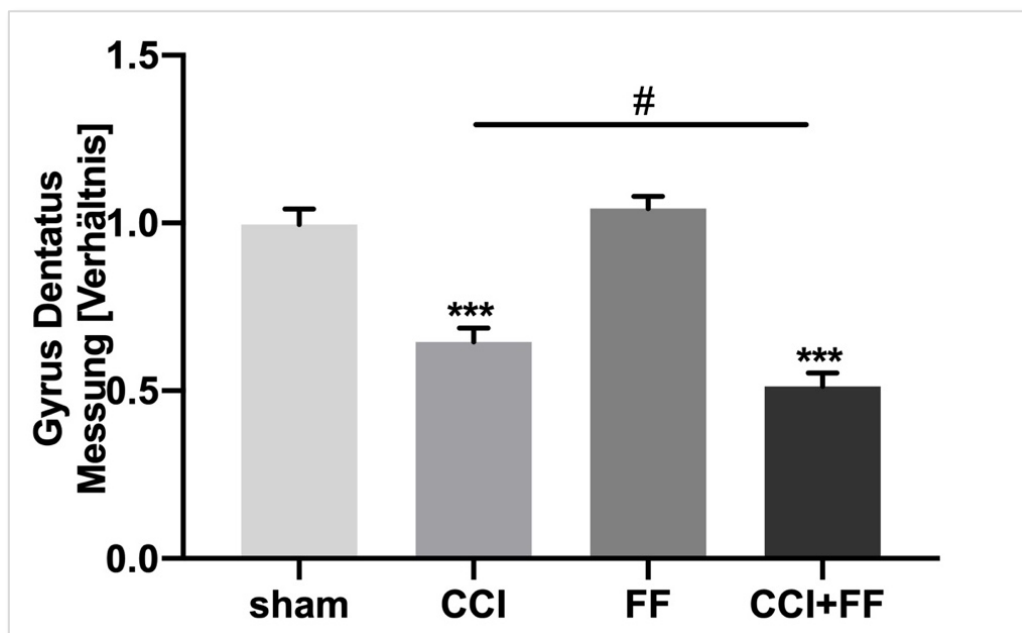


Diagramm 10: Ergebnisse der Gyrus Dentatus Messung

Signifikante Verringerung der Gyrus Dentatus Dicke in der CCI + FF Gruppe (n=44) und CCI Gruppe (n=44) im Vergleich zu Sham (n=25) und FF-Gruppe (n=48). Zudem konnte ein signifikanter Substanzdefekt nach FF im Vergleich zu der CCI Gruppe festgestellt werden, welches einen Hinweis auf eine Verschlechterung des Substanzverlusts der Hippocampusregion nach einer zusätzlichen Verletzung darstellt. Berechnung der Breitenverhältnisse der ipsi- und kontralateralen Körnerzellschicht des Hippocampus. Dargestellt als Verhältnis zwischen ipsi- und kontralateraler Seite. Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW +/- SEM. P Wert Bestimmung durch Holm Sidak's multiple comparison test. # $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

6.2.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbung

In dieser Teilstudie wurde primär die Iba-1-Mikroglia-Färbung und die GFAP-Astrozyten-Färbung durchgeführt, um die Aktivierung von Gliazellen an verschiedenen Stellen im lädierten Gehirn zu ermitteln. Hierzu wurden im Cortex in der ipsilateralen Hemisphäre periläsional als auch in der spiegelbildlichen Region der unverletzten, kontralateralen Hemisphäre mittels konfokaler Lasermikroskopie Bilder aufgenommen. Ebenso wurde für die Aufnahme der Färbungen in Sham-Tieren verfahren. Dies wurde für alle Versuchsgruppen durchgeführt. Im Anschluss fand eine digitale Quantifizierung immunpositiver Strukturen statt. Im Vergleich der ipsikontusionalen mit der kontralateralen Seite stieg die Anzahl der GFAP als auch der Iba-1-positiven Zellen in den CCI- und CCI + FF-Gruppen signifikant gegenüber der FF- und Shamgruppe an ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$). Jedoch war beim Vergleich des Verhältnisses von **Iba-1-immunpositiven Zellen** in ipsi- und den entsprechenden kontralateralen Hemisphären der kombinierten Interventionsgruppe mit der isolierten CCI Verletzung kein Einfluss auf die Anzahl oder Verteilung der immunpositiven Iba-1-Zellen zu entdecken. In der CCI-Gruppe ergab sich in etwa eine Iba-1 Zellzahl von $9,34 \pm 2,72$ Zellen. In der FF Gruppe eine Zellzahl von $1,1 \pm 0,24$ Zellen, in der Sham Gruppe $2,4 \pm 0,92$ Zellen. In der CCI + FF konnte eine Iba-1- Zellzahl von $8,71 \pm 2,23$ Zellen quantifiziert werden. Der Vergleich der CCI- und Polytraumagruppe ergab keine signifikanten Unterschiede. In Diagramm 11 werden die ausgezählten ipsilateralen und kontralateralen Bereiche für die vier Gruppe nach 120 h graphisch dargestellt.

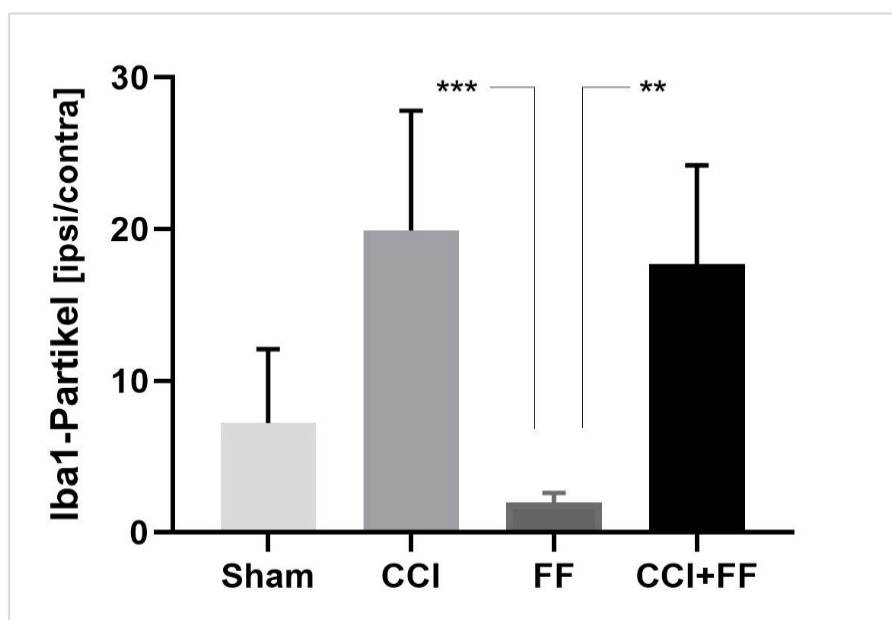


Diagramm 11: Ergebnisse der Iba-1 Immunzell Auswertung

Eine kombinierte FF mit einem CCI führt zu einer Erhöhung der Iba-1 immunpositiven Partikeln in der periläsionalen Region, im Sinne einer möglichen Mikrogliaaktivierung, im Vergleich mit den FF- und Shamtieren, jedoch führte eine kombinierte Verletzung zu keinem Einfluss auf die Verteilung und Anzahl der Iba-1 immunpositiver Zellen im Vergleich mit einem isolierten CCI-Trauma. Darstellung der Quantifizierung von Iba-1-Partikel in allen vier Vergleichsgruppen (sham= 6, CCI=10, FF=10, CCI+FF=10) als Verhältnis der ipsi- zur kontralateralen Hemisphäre zum Zeitpunkt 120 h nach Trauma. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW +/- SEM. P-Werte wurden mit Holm-Sidak's-Test ermittelt.

Bei der Betrachtung der **GFAP-immunpositiven Zellen** konnte eine erhöhte Anzahl an Zellen in der Gruppe der CCI und CCI + FF-Gruppe im Vergleich zu FF und Sham-Tieren festgestellt werden. Zudem konnte eine erhöhte Zahl der immunpositiven GFAP-Strukturen im periläsionalen Bereich der Polytraumatierte gegenüber dem isolierten CCI Trauma festgestellt werden ($p=0,0001$). Dieses spricht für eine Zunahme der periläsionale Astrogliose nach einer Kombination eines CCI Traumas mit einer Femurfraktur im Vergleich zu isolierten Traumata. Das Verhältnis von GFAP-immunpositiven Zellen in ipsi- und den entsprechenden kontralateralen Hemisphären ist bei Mäusen der CCI + FF Gruppe signifikant erhöht ($p<0,0001$). In der Sham-Gruppe ergab sich in etwa eine GFAP Zellzahl von $0,40 \pm 0,07$ Zellen. In der CCI-Gruppe ergab sich in etwa eine GFAP Zellzahl von $8,99 \pm 0,28$ Zellen. In der FF-Gruppe ergab sich in etwa eine GFAP Zellzahl von $1,07 \pm 0,2$ Zellen und in der CCI + FF konnte eine GFAP- Zellzahl von $10,36 \pm 0,19$ Zellen quantifiziert werden. Interessanterweise ließ sich beobachten, dass auch Tiere mit einer einzelnen FF Verletzung im Vergleich zu den Sham-Tieren ($p=0,061$) eine erhöhtes Hemisphärenverhältniss an immunpositiven Zellen zeigen. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass eine isolierte Femurfraktur als Stimuli für die Aktivierung zerebraler Astrozyten fungiert. Dies ist in Diagramm 12 graphisch dargestellt.

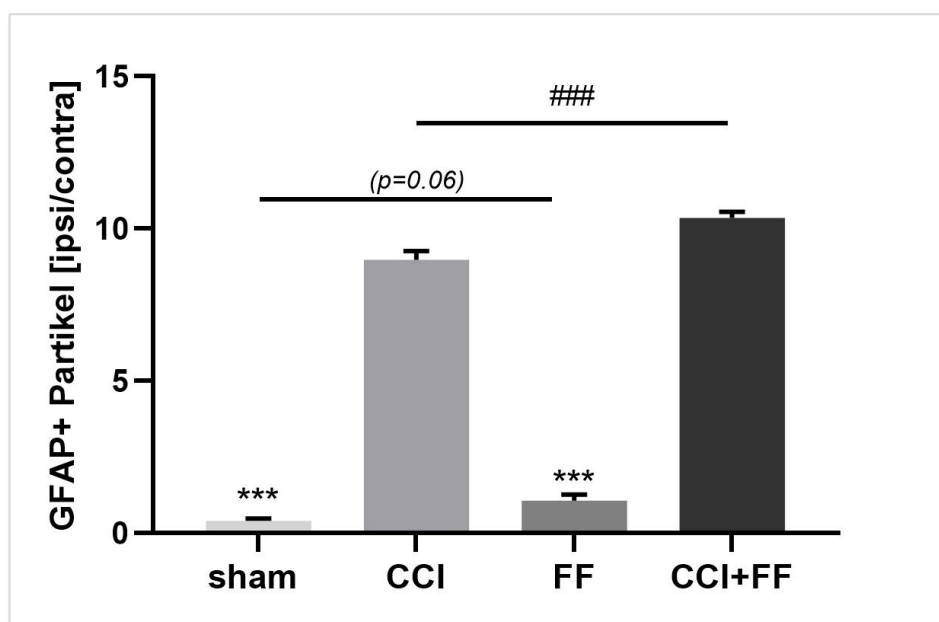


Diagramm 12: Ergebnisse der GFAP- Immunzell Auswertung

Vergleich der GFAP-Expression. Eine kombinierte FF mit einem CCI führt zu einer Erhöhung der periläsionalen GFAP-Partikel, im Rahmen einer möglichen Astrogliose, im Vergleich mit den FF- und Shamtieren, zudem führte eine kombinierte Verletzung zu einem Einfluss auf die Verteilung und Anzahl der GFAP immuno-positiven Zellen im Vergleich mit einem isolierten CCI-Trauma. Darstellung der Quantifizierung von GFAP in allen vier Vergleichsgruppen (sham= 7, CCI=12, FF=12, CCI+FF=11) als Verhältnis der ipsi- zur kontralateralen Hemisphäre zum Zeitpunkt 120 h nach Trauma. *** $p<0,0001$ im Vergleich zu CCI und CCI + FF, ### $p<0,001$. Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW +/- SEM. P-Werte wurden mit Holm-Sidak's- multiple comparison test ermittelt.

6.3 Genexpressionsanalyse

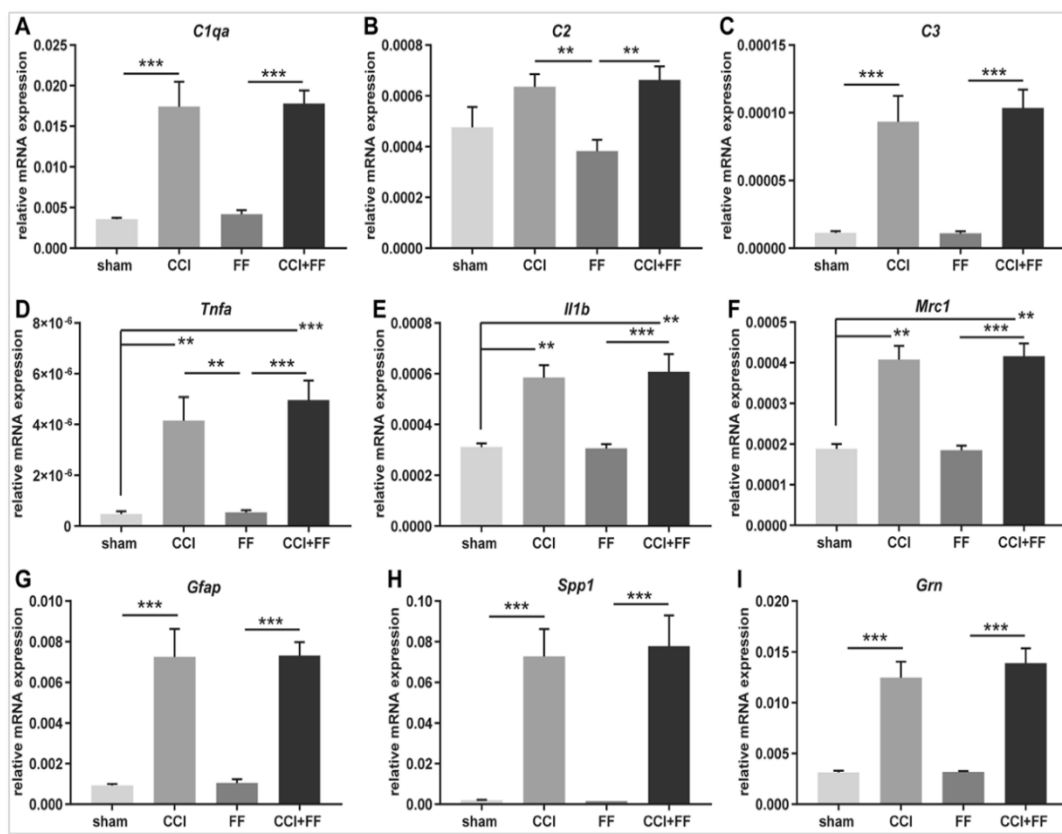


Diagramm 13: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Es fand eine Hochregulation aller Marker im verletzten Hirngewebe der CCI und CCI + FF Gruppe im Vergleich zur FF und/oder Sham Gruppe statt. Jedoch konnte kein Unterschied zwischen CCI und CCI + FF Gruppe festgestellt werden welches dafür spricht, dass die durch ein CCI induzierte Genexpression nicht durch eine Femurfraktur beeinflusst wird. Darstellung der untersuchten Genexpression der auf PPIA normalisierten Marker aus periläsionalem Hirngewebe der vier Versuchsgruppen (sham=7, CCI=12, FF=12, CCI+FF=11) an Tag 5, durchgeführt für *C1qa* (A), *C2* (B), *C3* (C), *Tnfa* (D), *Il1b* (E), *Mrc1* (F), *Gfap* (G), *Spp1* (H), *Grn* (I). ** p < 0,01 *** p < 0,001. *** p < 0,001 im Vergleich zu CCI und CCI + FF für *C1qa*, *C3*, *Gfap*, *Spp1* und *Grn*. Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW +/- SEM. P-Wert Berechnung wurde mittels One-way.-ANOVA und HolmSidaks-, bzw. Dunn's multiple comparisons test durchgeführt (*Mrc1*).

Um die Entzündungsreaktion des Gehirns aufgrund der induzierten Verletzung darzustellen und zu quantifizieren, wurde durch mittels qPCR eine Genexpressionsanalyse einer Gruppe von Markern durchgeführt. Diese umfassen proinflammatorische Zytokine wie TNF α und IL-1 β , Komplementfaktoren wie C1QA, C2, C3, der M2-Mikroglia/Makrophagen-Marker MRC1/CD206 und der Astrozytenaktivierungsmarker (GFAP). Im verletzten Hirngewebe von CCI und CCI + FF-Tieren mit Sham- bzw. FF-Tieren konnte eine Hochregulation aller Marker festgestellt werden. Allerdings konnte hierbei kein Unterschied zwischen CCI und CCI + FF Mäusen festgestellt werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es zu keiner Beeinflussung der simultan durchgeführten FF auf die CCI induzierte Genexpression von Entzündungsmarkern im Gehirn gekommen ist.

6.4 Western Blot

6.4.1 Nachweis von GFAP im Hirngewebe

Um die GFAP-Proteinspiegel im ipsilateralen Hirngewebe zu analysieren, wurde ein Western Blot durchgeführt. In diesem konnten höhere Spiegel des analysierten Proteins GFAP in den Gruppen der CCI und CCI + FF-Fraktur im Vergleich zu den FF- und Sham-Tieren festgestellt werden (sham vs. CCI $p=0,0005$; sham vs. CCI + FF $p=0,0009$; CCI vs. FF $p=0,0005$; FF vs. CCI + FF $p=0,0009$). Jedoch konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen Tieren mit einem isolierten Hirnschaden und einem kombinierten Hirnschaden festgestellt werden (siehe Diagramm 14).

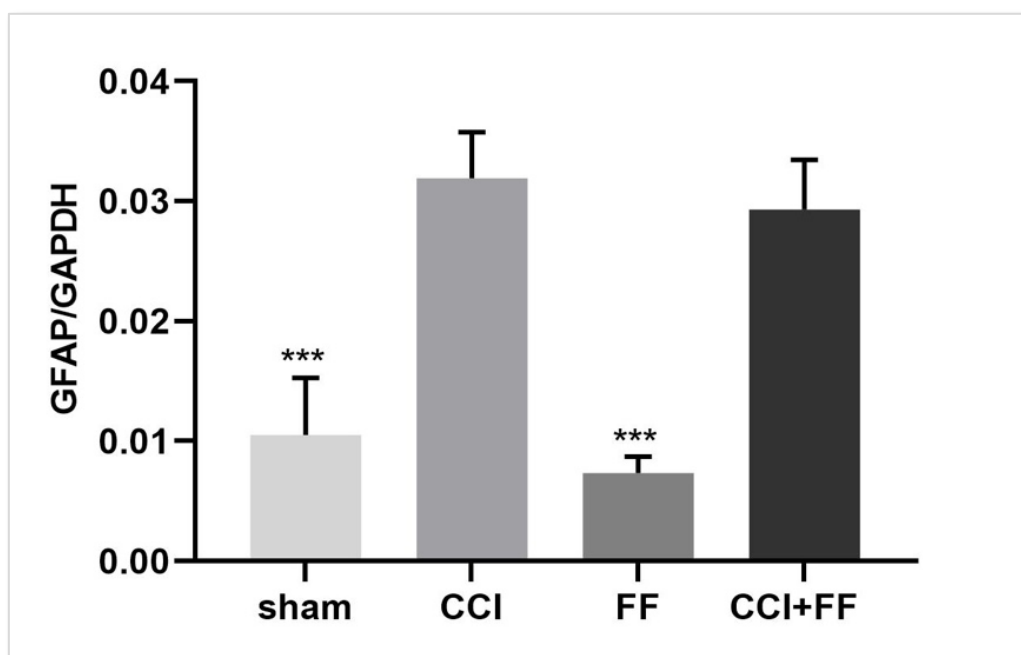


Diagramm 14: Ergebnisse der Proteinkonzentration von GFAP

CCI und CCI + FF Tiere zeigen eine gesteigerte Proteinexpression von GFAP im periläsionalen Hirngewebe im Vergleich zu den FF- und Sham-Tieren. Dabei konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen der CCI und der CCI + FF Gruppe festgestellt werden, welches vermuten lässt, dass die FF keinen Einfluss auf die Proteinexpression nach einem CCI hat. Quantifizierung des Proteins GFAP normalisiert auf GAPDH in ng / ml mittels Western Blot in allen Versuchsgruppen (sham = 5, CCI = 9, FF = 6, CCI+FF = 10). $***p<0,001$ im Vergleich zu CCI und CCI + FF. Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW +/- SEM. One-way ANOVA, p-Werte wurden mit Holm-Sidak's t-Test ermittelt.

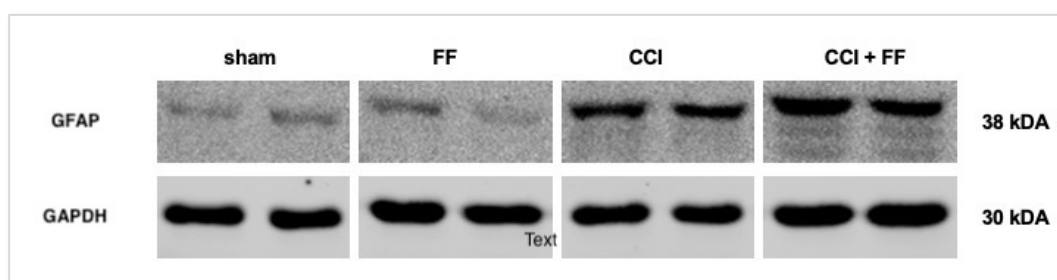


Diagramm 15: Darstellung eines Western Blot

Dieser zeigt eine durch den Schaden hochregulierte GFAP Proteinexpression im periläsionalen Hirngewebe zum Zeitpunkt 120 h nach einem Trauma. GAPDH wurde als Referenzprotein verwendet.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

6.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung von Progranulin und Osteopontin im Plasma

Es wurden für alle Tiere der verschiedenen Interventionsgruppen eine Expressionsanalyse für die Proteine Progranulin und Osteopontin im Plasma mittels der ELISA auf die o.g. Weise durchgeführt.

6.4.3 Progranulin

Progranulin (PGRN), Vorläuferprotein von Granulin, ist ein Glykoprotein, welches in Zusammenhang mit Wundheilung (240), Tumorentstehung (241), degenerativen Erkrankungen (242-244) und Inflammation (150, 245-247) gebracht wird. Zudem wird es in Chondrozyten und in Knorpel ausgebildet (248). PGRN wird außerdem einen modulierenden Einfluss auf die Knochenheilung zugesprochen (249). Die PRGN-Plasmaspiegel wurden durch einen ELISA quantifiziert. Die Expression von Progranulin war in der Polytraumagruppe im Vergleich zur den FF ($p=0,046$) und Shamgruppe ($p=0,0247$). signifikant erhöht. Die Konzentration von PRGN in der Shamgruppe war $804,9 \pm 75,19$ ng / ml. In der CCI-Gruppe wurde eine Konzentration von $959 \pm 81,55$ ng / ml und in der FF Gruppe $900 \pm 52,53$ ng / ml gemessen. In der CCI + FF-Gruppe konnte die höchste Plasmakonzentration von $1169 \pm 75,64$ ng / ml bestimmt werden (siehe Diagramm 16).

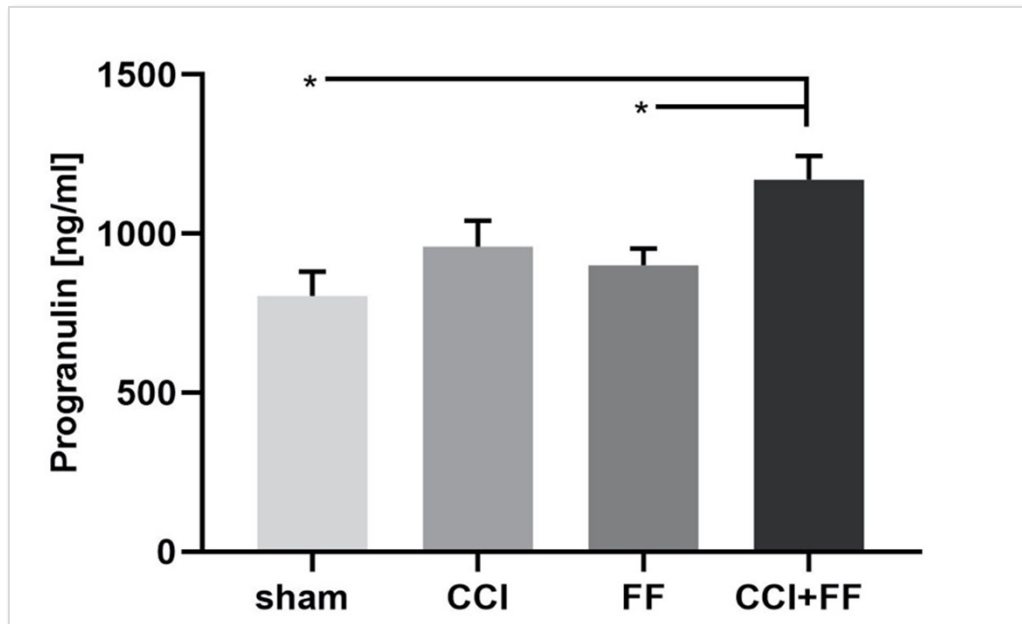


Diagramm 16: Ergebnisse der Progranulin Bestimmung

Eine kombinierte Verletzung von FF und CCI führt zu einer Erhöhung der posttraumatischen Plasmaspiegel von Progranulin. Der PGRN Spiegel war im Vergleich der CCI und CCI + FF mit FF und Shamtieren erhöht. Darstellung des mit einem ELISA bestimmten Plasmaspiegels von Progranulin in ng / ml nach 120 h der vier Versuchsgruppen (sham = 6, CCI = 12, FF = 12, CCI+FF = 11). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW \pm SEM. One-way ANOVA, p-Werte wurden mit Holm-Sidak's multiple comparison test ermittelt.

6.4.4 Osteopontin

Das Protein Osteopontin ist ein proinflammatorisches Zytokin welches in verschiedenen Zellen und Geweben, wie den aktivierten Makrophagen und T-Lymphozyten vorkommt (250). Es besteht aus 300 Aminosäuren und ist 34-kDa schwer (251). Diesem wird eine regulatorische Rolle nach Verletzungen oder Entzündungen zugesprochen (252). Der zugehörige spezifische Rezeptor ist dabei CD-44. Interessanterweise wurden in anderen Experimenten die Hochregulation von sowohl dem Liganden CD-44 als auch dem Rezeptor OPN nach einem SHT beobachtet, welches eine autokrine oder parakrine Regulationschleife nahelegt (253). Die Konzentration von OPN in der Shamgruppe war $110,8 \pm 8,6$ ng / ml. In der CCI-Gruppe wurde eine Konzentration von $150,3 \pm 6,67$ ng / ml und in der FF Gruppe $149,6 \pm 7,07$ ng / ml gemessen. In der CCI + FF Gruppe konnte die höchste Plasmakonzentration von $186,6 \pm 7,01$ ng / ml bestimmt werden. Der Unterschied zur Sham- ($p < 0,0001$), CCI- und FF-Gruppe (jeweils $p = 0,0027$) war jeweils signifikant. Es konnte kein statistischer Unterschied zwischen CCI und FF festgestellt werden. Jedoch war die OPN Plasma Konzentration in den Polytrauma Tieren im Vergleich zu den isolierten Traumata erhöht. Somit kann ein additiver Effekt der kombinierten Verletzung angenommen werden.

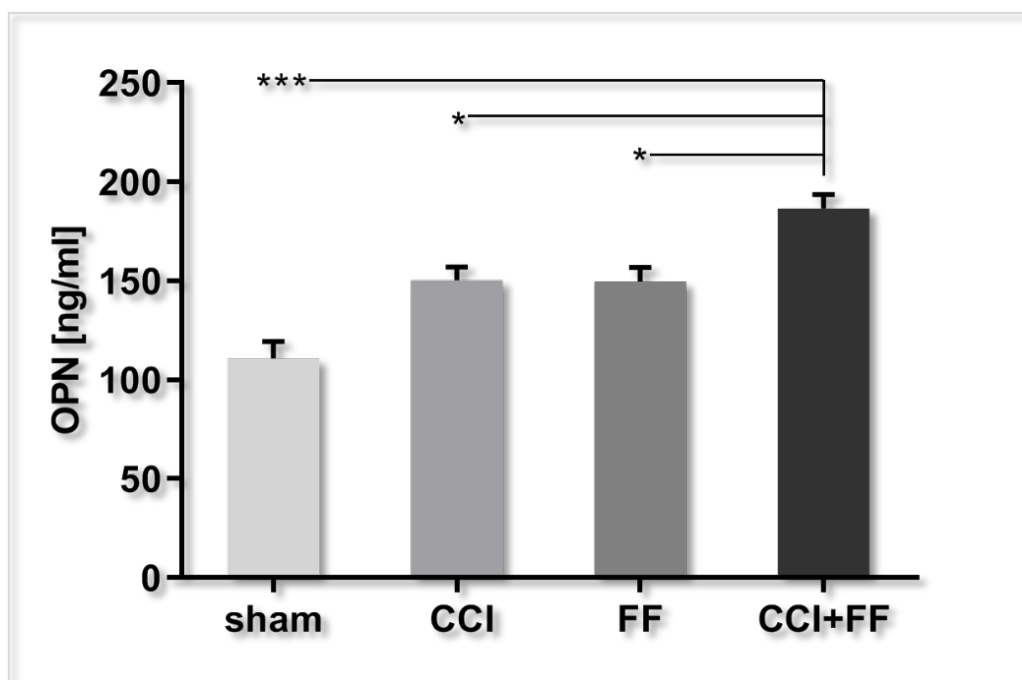


Diagramm 17: Darstellung der Osteopontin Bestimmung

Eine kombinierte Verletzung von FF und CCI führt zu einer Erhöhung der posttraumatischen Plasmaspiegel von Osteopontin. Der OPN Spiegel war sowohl im Vergleich der CCI und CCI + FF mit FF und Shamtieren erhöht, als auch im Vergleich zwischen CCI und CCI + FF. Darstellung des mit einem ELISA bestimmten Plasmaspiegels von Osteopontin in ng / ml nach 120 h der vier Versuchsgruppen (sham = 5, CCI = 12, FF = 11, CCI + FF = 11). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Darstellung der Ergebnisse bzw. den gemessenen Parametern erfolgt als MW +/- SEM. One-way ANOVA, p-Werte wurden mit Holm-Sidak's multiple comparison test ermittelt.

7 Diskussion

7.1 Das Polytrauma-Modell

Das Polytrauma ist eine heterogene Verletzung, bei der kein Trauma einem anderen gleicht. Verletzungen des Kopfes als auch der Extremitäten machen mit einer Häufigkeit von 80 % bzw. 27,5 % einen Großteil der relevanten Verletzungen aus (14). Aus diesem Grund spielen diese Verletzungsmuster, eine entscheidende prognostischen Rolle bei der Gruppe der Polytraumapatienten. Durch den Unfallhergang kommt es zu einer primären Schädigung des Gehirns, wodurch pathophysiologische Prozesse in Gang gesetzt werden, die bislang keiner Intervention zugänglich sind. Dem ersten Prozess schließt sich ein sekundärer Hirnschaden an, welcher die Prognose des Patienten unmittelbar entscheidet, potenziell mittels Therapieansätzen beeinflusst werden kann und somit ein zentraler Gegenstand aktueller Forschung darstellt. Man nimmt an, dass eine mit SHT kombinierte (Femur-)Fraktur den Sekundärschaden maßgeblich moduliert und somit einen Einflussfaktor auf das neurologische Outcome des Patienten darstellt. Daher ist es wichtig, die Pathophysiologie der gegenseitigen Wechselwirkungen der simultanen Traumata genauer zu untersuchen. Das Ziel dieser Studie war es, ein realitätsnahes Polytrauma-Modell an der Maus zu etablieren und die sich anschließenden Vorgänge und Folgen exemplarisch herauszuarbeiten und zu quantifizieren. Mit diesem Ziel wurde, angelehnt an die Methodik vorausgegangener Studien, eine definierte kortikale Kontusionsverletzung als Modell für ein SHT mit einer Femurfraktur kombiniert. Hierbei wurde auf ein Modell, welches in den 90er Jahren entwickelt wurde, zurückgegriffen, in dem nach einer Kraniotomie ein pneumatisch oder wie hier elektromagnetisch betriebener Bolzen auf die intakte Dura mater (harte Hirnhaut) zwischen Bregma und Lambda beschleunigt wird (214). Diesem schloss sich eine stumpfe, traumatische Weichteil- und Knochenverletzung (geschlossene Femurfraktur) an. Mit den der Interventionen folgenden histopathologischen, immun- und molekularbiologischen Untersuchungen konnte ein Vergleich der pathophysiologischen Auswirkungen der Femurfraktur auf das CCI im Vergleich zu den Einzelverletzungen (CCI, FF) gezogen werden.

Das CCI-Modell ist ein weltweit verbreitetes tierexperimentelles Verfahren, zu dessen Vorteilen die Einfachheit, Reproduzierbarkeit, niedrigen Kosten sowie Validität zählen. Zudem ist es mit einer geringen Sterblichkeit der Versuchstiere verbunden (132, 209, 254). Durch die stereotaktische Fixierung und die Durchführung der Versuche durch die gleiche Person, lassen sich die Ergebnisse der Studie gut vergleichen. Die Geschwindigkeit, Eindringtiefe und Applikationsdauer können bei jedem Versuchstier reproduziert, sowie das Ausmaß des Schadens variiert werden (132, 254). Zudem ist als ein Vorteil des gewählten Modells, die durch die Anpassung der Parameter, gute Kontrollierbarkeit der Schadensgröße hervorzuheben (132). Des Weiteren lassen sich die Schädigungsparameter, je nach Fragestellung variieren, da eine Korrelation zwischen den histopathologischen Schädigungen

und den kognitiven Defiziten in Höhe, Geschwindigkeit und Schadenstiefe bestehen (132). Für die verschiedenen Spezies liegen empirische Daten bzgl. der Schadenslokalisierung und der zu verwendenden Schädigungsparameter vor (255). Da der Schaden nur auf einer Hemisphärenseite gesetzt wird, kann die kontralaterale Seite geeignete Vergleichswerte für histologische und biochemische Untersuchungen liefern (132, 254). Neben der kortikal erzeugten Verletzung, entsteht häufig, wie auch in der hier vorliegenden Studie, eine Kontusion in subkortikalen Arealen wie z.B. dem Hippocampus. Dies kann zu posttraumatischen Dysfunktionen mit kognitiven und sensomotorischen Defiziten führen, also Ausfälle, die mitunter auch beim Menschen zu beobachten sind (256).

Ein Nachteil des CCI Modells ist, dass sich das Setzen des Schädelhirntraumas unter den experimentellen und kontrollierten Laborbedingungen in der Anästhesie maßgeblich von den individuellen Unfallhergängen der Patienten unterscheidet. Die mögliche Beeinflussung durch sedierende Medikamente oder durch die chirurgische Präparation am Kranium, kann durch die Hinzunahme einer Sham-Gruppe, die nur der Anästhesie unterliegen, minimiert werden (255). Eine weitere Schwäche des verwendeten Modells ist, dass die harte Hirnhaut in Mitleidenschaft gezogen werden kann. Diese ist gerade bei Mäusen sehr zart und daher sehr vulnerabel, aus diesem Grund gilt es eine Verletzung Dura mater zu vermeiden (132). Zudem wird ein großflächiger Schaden gesetzt, wodurch es zu einer fast vollständigen Zerstörung des ipsilateralen Kortex kommt. Dies ist bei SHT Patienten nicht der Fall, hier fällt das Schadensareal im Vergleich zum restlichen Gehirnvolumen eher gering aus (209). Kommt es zu einem unvollständigen Verschluss des CCIs, fällt die Wirkung der ICP Erhöhung durch eine Dekompression nicht so wie erwartet aus. Die sich anschließenden Komplikationen, wie ein mögliches Hirnödem, fallen somit geringer aus. Ein weiterer Kritikpunkt des Modells ist, dass kein Schaden am Hirnstamm gesetzt wird und somit kein Zustand einer tiefen Bewusstlosigkeit ausgelöst wird, welcher oft bei SHT Patienten beobachtet wird und so natürlich die Mortalität der Versuchstiere senkt (132, 209).

Bonnarens und Einhorn haben im Jahre 1984 das erste Femur-Fraktur-Modell in der Ratte beschrieben (216). Dabei wurde das Femur mit einem Steinmann Nagel versorgt und anschließend mittels eines Gewichts frakturiert. In der vorliegenden Studie wurde dies versucht nachzuempfinden und so konnte ein für unser Labor standardisiertes Femur-Fraktur-Modell in der Maus etabliert werden. Die Fraktur des Femurs hat gegenüber dem Tibiamodell einen entscheidenden Vorteil: mögliche störende Einflüsse eines weiteren Knochens, wie es beim Unterschenkel durch die Fibula der Fall ist, können so am Oberschenkel ausgeschlossen werden. Radiologisch konnte durch das Modell eine sichere, reproduzierbare Querfraktur nachgewiesen werden (216). Ein Nachteil dieses Modells ist, die beschränkte neurologische Beurteilung der Versuchstiere durch die Femurfraktur bedingte motorische Einschränkung.

Hierbei konnte nicht klar quantifiziert werden, ob das beobachtete Defizit aus dem gesetzten CCI stammt oder aus der Femurfraktur resultierte (216).

7.2 Die Maus als Versuchstier

Nagetiere als Versuchstiere sind günstig in der Anschaffung und im Unterhalt, zudem sind sie leicht und ohne großen Aufwand zu halten (132). Aufgrund dieser Faktoren gibt es eine hohe Anzahl an Studien zu Schädelhirntraumata bei Nagetieren, welches zu einer höheren Vergleichbarkeit der generierten Daten führt. Jedoch finden die meisten Tierstudien über einen identischen Beobachtungszeitraum statt, somit findet man bislang nur wenige Tierstudien zu den Wechselwirkungen einer FF auf ein CCI, die über eine Zeitdauer von 5 Tagen, wie in der hier vorliegenden Studie, stattfinden. Mausmodelle bieten eine hervorragende Möglichkeit, wichtige Verletzungsmechanismen zu identifizieren, die durch verschiedenen Arten von Verletzungen (Gehirnerschütterungen, Quetschungen und Penetrationsverletzungen) verursacht werden (132). Das Genom der Maus zeigt eine erhebliche Übereinstimmung mit dem menschlichen, sodass genetische Manipulationen im Mausmodell eine hohe Übertragbarkeit auf die Funktion der manipulierten Gene im Menschen aufweisen. So lassen sich Schlüsselmoleküle und -pfade als mögliche Therapieoption identifizieren (132). Für die Verwendung von Mäusen in der Grundlagenforschung der Neuroprotektion spricht, dass bei Mäusen gleich wie beim Menschen die Neuroinflammation als Reaktion auf ein SHT eine Hauptrolle spielt (132). Allerdings gibt es Unterschiede im skelettalen sowie neuronalen Aufbau, so fehlen beispielsweise die Havers Kanälen in den Knochen der Nagetiere, und der Winkel des kranio-cervikalen Übergangs weicht vom menschlichen ab (254). Gerade letzteres kann mit einer von der Erwartungshaltung abweichenden Reaktion auf ein SHT verbunden sein und dazu führen, dass keine vollständige Übertragung der generierten Daten auf den Menschen möglich ist (254).

Beim SHT handelt es sich um eine heterogene Verletzung mit unterschiedlichen Ausprägungen, Komorbiditäten, Begleitverletzungen und beeinflussenden Faktoren wie einem möglichen Substanzmissbrauch. Daher können nur Teilaspekte aus dem klinischen Alltag auf aktuelle Tierexperimente übertragen werden. Somit ist es mit gegenwärtigen Modellen nicht möglich, die gesamte zugrundeliegende Pathophysiologie zu erforschen und zu verstehen (257). Des Weiteren ergaben retrospektive Analysen von durchgeführten Autopsien, dass 90 % der SHT Patienten schwere ischämische Läsionen aufwiesen (258, 259). Bei tierexperimentellen Studien werden meist Modelle gewählt, die einen guten Blutfluss und metabolische Aspekte gewährleisten, also als mild-moderate SHT eingestuft werden können und zu keinen schweren Ischämien führen (258, 259). Zudem werden selten klinische Beobachtungen von Langzeitperioden mit SHT im Tiermodell, wie z.B. mit einer Beeinträchtigung des Bewusstseins, gemacht, obwohl viele Patienten nach einem SHT Trauma in einem komatösen Zustand verweilen.

Eine weitere, nicht zu vernachlässigende Rolle nimmt das Geschlecht der Versuchstiere ein. Weibliche Tiere zeigen eine geringere Rate an Komorbiditäten und Komplikationen auf, vermutet wird eine neuroprotektive Komponente weiblicher Geschlechtshormone (260). Daher werden die meisten Modelle an männlichen Versuchstieren durchgeführt. So lässt sich die Vergleichbarkeit der Ergebnisse steigern, da es zu weniger Verzerrungen aufgrund von Hormonschwankungen kommt (254, 260). Die Versuche der hier vorliegenden Studie wurden an weiblichen Versuchstieren durchgeführt, somit wäre perspektivisch eine Vergleichsstudie mit männlichen Tieren denkbar. Darüber hinaus ist das Alter der Versuchstiere von großer Bedeutung. Es lässt sich eine juvenile von einer senilen Knochenheilung unterscheiden. So weist ein juveniler Knochen eine sehr viel schnellere Regenerationszeit als ein seniler Knochen auf (164, 261, 262). Ältere Versuchstiere unterliegen, wie das ältere Patientenkollektiv im klinischen Alltag auch, einer höheren Mortalität sowie einer gesteigerten Neuroinflammation (132, 212). Dieses spiegelt sich in den Ergebnissen der Studien wider und sollte bei der Deutung dieser in Betracht gezogen werden (254). Folglich sollten, um die gesundheitsökonomische Relevanz mit erfassen zu können, in Zukunft mehr ältere Versuchstiere in die Grundlagenforschung eingeschlossen werden (132, 254).

Weitere Aspekte, die die Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen beschränken, sind, dass die Evaluation der klinischen Defizite, wie Emotionen oder die sprachliche Komponente, im Mausmodell nicht adäquat erfasst werden können (209). Anders als beim Menschen, bei dem kognitive Defizite im Vordergrund stehen, wird der Fokus der meisten tierexperimentellen Arbeiten auf das sensomotorischen Outcome gesetzt (254). Natürlich wären größere Säugetiere und nichtmenschliche Primaten aufgrund der Nähe ihrer physiologischen Eigenschaften zum Menschen besser geeignet, um die pathophysiologischen Prozesse besser abzubilden und zu erforschen. Gerade Primaten spielen in der Hirnforschung eine große Rolle, da die Gehirne dieser Spezies die einzigen sind, die an die menschliche Komplexität heranreichen. Dies ist aber aufgrund von verschiedenen ethischen, monetären und haltungstechnischen Faktoren nicht umsetzbar (132).

Ein weiterer Nachteil ist, dass außer den Resultaten der verhaltensbiologischen Tests und der Erhebung des Körpergewichts, die restlichen Daten nur zu einem Zeitpunkt, am fünften Tag nach Schadenssetzung, erhoben wurden. Aussagen zu den Ergebnissen der Tage davor lassen sich nur unzureichend treffen und sind, wenn dann spekulativ.

7.3 Verhaltensbiologische Testung

7.3.1 Klinische Untersuchungsparameter

Die täglichen Untersuchungen der Versuchstiere zur Beurteilung des Aktivitätsverhaltens, des neurologischen Zustands und des Wohlbefindens sollte zur gleichen Uhrzeit und vom gleichen Untersucher durchgeführt werden. Definierte Untersuchungszeitpunkte zur Beobachtung und

Versuchsdurchführung steigern die Validität der Untersuchungsergebnisse. Somit kann gewährleistet werden, dass der Einfluss auf das Verhalten der Tiere, durch beispielsweise Stress, welcher durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden kann, minimiert wird. Zur Kontrolle von kleinsten Einschränkungen des Wohlbefindens wurde mittels Ermittlung des Körpergewichtes das Fressverhalten beurteilt. Dadurch lässt sich eine verminderte Nahrungsaufnahme bzw. ein krankheitsbedingter Katabolismus erfassen. Ein weiterer Messparameter ist das Erfassen der Körperinnentemperatur als repräsentativer Indikator für die Homöostase und der Stoffwechselaktivität (263, 264). Eine erhöhte Körperkerntemperatur lässt eine Steigerung des Metabolismus durch eine Entzündungsreaktion oder einer vermehrten systemischen Aktivität vermuten. Eine verminderte Körperkerntemperatur lässt auf ein Erschöpfen der Thermoregulation schließen und ist ein Prognosefaktor für die Letalität der Versuchstiere (263, 264). Wichtig hierbei ist, dass die Temperatur vor jeglichen Manipulationen, wie dem Durchführen des NSS oder dem Wiegen durchgeführt wird. Dieser Parameter wurde in der vorliegenden Studie nicht erfasst und könnte in zukünftigen Studien in Betracht gezogen werden.

7.3.2 Neurological Severity Score

Das SHT hat definitionsgemäß eine neuro-motorische Funktionseinschränkung zur Folge, welches durch verschiedene Tests erfasst werden kann. Bereits veröffentlichte Studien belegen, dass der Neurological Severity Score ein verlässliches Messinstrument zur Evaluation des neurologischen Defizits nach Schädel-Hirn-Verletzungen darstellt (265). Zudem lassen sich mittels des NSS die Versuchsgruppen gut vergleichen (266). Beim Menschen wird zur Klassifikation des SHT die GCS herangezogen, welche der NSS beim Tier versucht nachzuempfinden (267). Jedoch ist der NSS kein Bewertungssystem, welches exakt der GCS entspricht und ist somit in seiner Aussagekraft limitiert. Auch in vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe konnte mittels NSS bestehende Aussagen bestätigt und neue Erkenntnisse gewonnen werden (268, 269). Aus diesem Grund wurde der NSS, inkl. Beam-Balance und Beam-Walking-Test, zur Untersuchung und Quantifizierung gewählt. Hierbei gilt, dass eine niedrige Punktzahl des NSS für ein geringeres Defizit spricht. In der hier vorliegenden Studie wurden die Wechselwirkungen einer Femurfraktur auf ein simultanes SHT im Mausmodell untersucht. Da die neurologische Beurteilung teilweise abhängig von der motorischen Funktion ist, wurde der NSS zur Abgrenzung der durch die Femurfraktur verursachten Beeinträchtigungen, in der CCI + FF- sowie der FF-Gruppe um den Beinbelastungstest ergänzt. Somit erfolgte eine vielseitige Untersuchung der Effekte der Femurfraktur, auch wenn eine vollständige Trennung der Beeinträchtigung aufgrund der Methodik durch die Femurfraktur nicht möglich war. Hier zeigten Tiere mit kombinierten Verletzungen im Vergleich zu Tieren mit einem isolierten Interventionsverfahren (CCI, FF) die stärksten neuromotorischen Beeinträchtigungen über eine Dauer von 5 Tagen. Zudem konnte

nur eine geringfügige Regredienz, d.h. neuromotorische Erholung über diese Zeitdauer in der Polytrauma-Gruppe beobachtet werden. Da dieser Effekt in den Gruppen mit einem Monotrauma nicht nachgewiesen werden konnte, wurde die Annahme gestärkt, dass eine Femurfraktur negative Auswirkungen auf die neuromotorische Leistung von Mäusen mit einem Schädelhirntrauma hat. Dies lässt sich also in Übereinstimmung mit früheren Befunden von Tieren mit kombinierten Hirn- und Beinknochenverletzungen bringen. Der NSS ist ein Summenscore, d.h. einzelne Punktwerte werden nicht betrachtet. Somit ist der Test anfällig für mögliche Ausreißer der Einzelergebnisse, der das Endergebnis innerhalb der Kategorie oder Gruppe zum Positiven oder Negativen verzerren kann.

7.3.3 Beinbelastungsscore

Der Beinbelastungsscore wurde durchgeführt, um den Effekt der Fraktur auf das neurologische Defizit weiter abzugrenzen, da die Mehrzahl der Aufgaben zur Bewertung des neurologischen Schadens die Fortbewegung umfassen. Um den Ursprung der motorischen Einschränkung, also ob ein neurologisches oder ein motorisches Defizit vorlag, zu identifizieren, wurde die Beweglichkeit und Belastung der hinteren Extremitäten der FF und CCI + FF Interventionsgruppen untersucht. Es erfolgte die separate Betrachtung der Beeinträchtigung des linken Beins. Hierbei zeigte die CCI + FF-Gruppe ein signifikant höheres Defizit gegenüber der FF-Gruppe an Tag 1 und erholte sich von Tag 1 bis Tag 5 wieder. Ab Tag 3 konnte kein signifikanter Unterschied mehr festgestellt werden, was die Annahme stärkte, dass die Femurfraktur als alleinige Ursache für den verschlechterten NSS am ehesten ausgeschlossen werden kann.

Die Einschränkung der Bewegungsfreiheit der Extremität konnte nur teilweise beurteilt werden, dementsprechend ist deren Aussagekraft als nur begrenzt zu bewerten einzustufen. Aus diesem Grund wurde, um einen möglichen Einfluss der eingeschränkten Extremitäten auf die durchgeführten Analysen bestmöglich abzugrenzen, die Beweglichkeit und Belastbarkeit der unteren Extremität von BBS und OFT getrennt beurteilt. Beide Bewertungen weisen ein leicht motorisches Defizit auf, welches durch das femorale Trauma verursacht wurde. Diese Beobachtung reicht allerdings nicht aus, um die anhaltenden neuromotorischen Beeinträchtigungen in der Polytrauma-Gruppe zu erklären. Ein additiver Effekt von CCI und FF auf die schwere motorische Beeinträchtigung und als Grund für das Versagen der neuromotorischen Erholung scheint plausibel zu sein. Andere Studien suggerierten, dass diese optisch keine Unterschiede zwischen den CCI und den CCI + FF ausmachen konnten, sie so also keine Einschränkung der Motorik nach CCI + FF annahmen (18). Dieses konnten wir nicht nachempfinden, daher ist eine Gliedmaßenfraktur als ein Störfaktor und eine Limitation der hier vorliegenden Studie anzusehen.

Mittels der durch NOLDUS gewonnene Daten, dem NSS, dem BBS sowie dem OFT erfolgte im Vergleich zu anderen Studien eine fortgeschrittene differenzierte Betrachtung der Effekte

der Femurfraktur auf den neurologischen Schaden. Perspektivisch ist eine Ergänzung des Neuroscores und des Beinbelastungstests mit anderen Verhaltenstests, wie dem Corner Test zur Testung sensomotorischer- und Haltungs-Asymmetrien (270) oder dem adhesive removal Test, welcher sensomotorische Defizite mittels Geschicklichkeits- und Sensitivitätstests der Pfoten und des Mundes testet, denkbar (271). Des Weiteren gibt es auch Verhaltenstest, die weniger von den motorischen Funktionen abhängig sind. Als Beispiel ist hier der T-/Y-maze Test zu nennen, in dem die Tiere lernen, ob sie in einem rechten oder linken Arm eines T-/Y-förmigen Ganges Futter finden. Ein weiteres Beispiel ist der Nesting Test, in dem die Qualität des Nestbaus der Versuchstiere beobachtet wird. Eine niedrige Qualität des Nestbaus wird in der Literatur als Indikator für Stress diskutiert.

7.3.4 Open Field Test

Um andere Aspekte der Verhaltensänderungen zu betrachten, haben wir die angstbedingten Häufigkeiten des Aufstellens und des Stretch-Attend-Posture (SAP) im Open Field Test (OFT) durch Quantifizierung bestimmt. Mäuse mit einer kombinierten oder einzelnen Verletzung zeigten ein vermindertes angstähnliches Verhalten an Tag 1 und Tag 3 im Vergleich zum präoperativen Zeitpunkt. Dies blieb bis zum Ende unseres Beobachtungszeitraumes an Tag 5 in der CCI + FF-Gruppe bestehen. Einige Studien gehen davon aus, dass traumatische Hirnverletzungen mit affektiven Störungen wie Angst in Verbindung gebracht werden können (272). Des Weiteren wurde auch eine postoperative kognitive Dysfunktion bei Versuchstieren nach operativen Eingriffen als postoperative Verhaltensbeeinträchtigung beobachtet (273). Diese ist eine Art transiente neurologische Komplikation, die durch eine Beeinträchtigung des Gedächtnisses, der Lernfähigkeit und der Konzentrationsfähigkeit definiert ist (274). Man geht davon aus, dass diese durch chirurgische Eingriffe getriggert und durch induzierte Entzündungsprozesse vermittelt wird. Bislang liegen jedoch nur wenige Daten zum Zusammenhang zwischen einem verminderten angstähnlichen Verhalten und einem gleichzeitigen CCI im murinen Modell vor. Dies erfordert weitere Beobachtungen und Untersuchungen, um zu verstehen, wie eine Femurfraktur das angstähnliche Verhalten in Kombination mit einem SHT beeinflusst.

7.4 Bewertung der histologischen Färbungen

7.4.1 Bewertung des Schadensvolumens

Bei der Nissl Färbung handelt es sich um eine Standardfärbung zur Darstellung von Nervengewebe. Hierbei kommt es zur Bindung vom basophilen Farbstoff Kresylviolett an basophile Strukturen wie DNA und RNA, somit werden also v.a. intakte Neurone violett gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden digitalisiert und das kortikale Ausmaß des Schadensareals mittels Software bestimmt. Außerdem wurde auf diesen Schnitten subkortikale Messungen durchgeführt. Hierfür wurde die Dicke des Körnerzellbandes im Gyrus Dentatus des

Hippocampus bestimmt. In der vorliegenden Studie fanden wir keine Differenz in der Größe des Läsionsvolumens der CCI + FF-Gruppe im Vergleich zur CCI-Gruppe. Somit konnte kein signifikanter Einfluss der FF auf das Läsionsvolumen nach SHT festgestellt werden. Jedoch konnte ein erhöhter Substanzverlust im periläsionalen Körnerzellband des Gyrus dentatus der Polytraumatierte festgestellt werden, welches einen Substanzverlust nach einer Kombination von FF und CCI vermuten lässt.

Im Gegensatz dazu steht eine Studie von Yang et al. aus dem Jahr 2016, die eine deutliche Zunahme des Läsionsvolumen 4d nach SHT bei kombinierter Knochenfraktur beobachten konnten (17). Eine weitere Möglichkeit, das Schadensareal zu quantifizieren, ist die von Schultz et al. verwendete Variante der Volumetrie mittels MRT Diagnostik. In dieser Studie wurde festgestellt, dass sich das Ventrikelvolumen im Gegensatz zu den anderen Versuchsgruppen Sham, FF und CCI, bei den PT Tieren signifikant vergrößert hatte (18). Dies lässt Rückschlüsse darauf zu, dass eine Knochenfraktur das Schadensareal im Gehirn vergrößerte. Vielleicht ist eine sensitivere Methode, wie diese Form der Quantifizierung, für zukünftige Studien in Betracht zu ziehen, um mögliche Gruppenunterschiede genauer herausarbeiten zu können.

Bei der vorliegenden Studie ist jedoch hervorzuheben, dass als ein Qualitätsmerkmal, ein besonderes Augenmerk auf das Reduzieren von Cofoundern gelegt worden ist. Beispielsweise wurde auf eine einheitliche Narkosedauer, sowie auf fehlende Unterschiede beim Körpergewicht zwischen den CCI Gruppen geachtet. Mit dem Nachweis eines Substanzverlustes nach Kombination von FF und CCI im Gyrus dentatus, gelang der Beleg eines augenscheinlich pathologischen Prozesses. Das der Nachweis einer Zunahme im Läsionsvolumens in der CCI + FF-Gruppe im Vergleich mit anderen Studien nicht gelang, ist möglicherweise auf die Auswahl der Versuchstiere (Alter, Geschlecht), der Frakturlokalisierung (welcher Knochen, ipsi- oder kontralateral zur Läsion) oder auch am Zeitpunkt des Erhebens des Schadens zurückzuführen.

7.4.2 Bewertung der immunhistologischen Färbung

Gliazellen werden bei Verletzung des ZNS aktiviert und ändern dabei ihre Morphologie (118, 275, 276). Diese gehen degenerativen, neurotoxischen, regenerativen und neuroprotektiven Funktionen nach, welche abhängig von der Polarisierung der Mikroglia sind. Dabei unterscheidet man die M1 Aktivierung, welche zytotoxisch sein soll, als auch die M2 Aktivierung, welcher eine neuroprotektive Komponente nachgesagt wird (119, 136). Diese unterschiedlichen, vom Zustand der Mikroglia abhängigen Effekte, überlagern sich im Laufe der Heilung nach einem SHT (277, 278). Um diesen Mechanismus zu quantifizieren, wurde eine Doppelimmunhistofärbung vom Astrozytenmarker GFAP und dem Mikroglia marker Iba-1 durchgeführt. Der periläsionale Anstieg von Gliazellen wurde schon häufiger im Zuge von SHT beobachtet und konnte auch in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden (279, 280).

Es konnte eine verstärkte periläsionale Astrogliose in CCI und CCI + FF-Tieren durch den Nachweis einer erhöhten Anzahl von GFAP und Iba-1 positiven Immunzellen im Vergleich zu Sham- und FF-Tieren beobachtet werden. Die Analyse der Immunfärbungen an periläsionalen Stellen in der verletzten sowie kontralateralen Hemisphäre ergab ein erhöhtes interhemisphärisches Verhältnis von reaktiven Astrozyten (erhöhte Anzahl an GFAP positiven Zellen) in der CCI + FF Gruppe im Vergleich zum isolierten CCI. Jedoch konnte dies nicht für Iba-1 Zellen (Mikroglia) nachgewiesen werden. Zudem konnte im Western Blot des Hirngewebes erhöhte, aber keine unterschiedlichen Proteinmengen von GFAP zwischen CCI und CCI + FF-Mäusen nachgewiesen werden.

Die erhöhte Inflammation, nachgewiesen durch die gesteigerte Astrogliose, korreliert mit der Annahme, dass es zu einer Aktivierung von Astrozyten nach einem SHT kommt. Zusammen mit den Ergebnissen der verhaltensbiologischen Tests, stimmt das nachgewiesene Ergebnis mit den Resultaten anderer Studien überein, in denen man annimmt, dass reaktive Astrozyten bei polytraumatisierten Mäusen eine neuromotorische Beeinträchtigung auslösen (18, 19). Die starke Aktivierung spricht für ein inflammatorisches Geschehen nach Fehlfunktion der BHS, mit einer damit verbundenen Invasion von Immunzellen in das ZNS.

Zusätzlich zu den oben geschilderten Beobachtungen fand auch ein Nachweis eines erhöhten Astrozytenverhältnisses von ipsi- zu kontraläsionalen Hemisphäre im unverletzten Gehirn der Femurfraktur-Gruppe statt. Hall et al berichteten 2016 von ihrer Beobachtung, dass Knochenbrüche an den Extremitäten bei Patienten eine zentrale sensomotorische Dysfunktion verursachen (281). Dabei wurde ein erhöhter proinflammatorischer Zytokinpiegel nach einer Tibiafraktur beobachtet (282). Diese Befunde sprechen für die Existenz retrograder Effekte nach einer Femurfraktur, welche möglicherweise in einer erhöhten Reaktivität der Astrozyten in dem hier vorliegenden Modell wiedergefunden werden (18, 282).

7.5 Bewertung der Genexpressionsanalyse

In Studien von Yang et al. aus dem Jahr 2016 sowie Shultz et al. aus dem Jahr 2015 gelang der Nachweis einer erhöhten mRNA-Expression bzw. Gehirngewebekonzentration von proinflammatorischen Zytokine IL-1 β zu frühen (24 h und 4d) und späten (35d) posttraumatischen Zeitpunkten (13, 14). TNF α , IL-1 β sowie IL-6 stehen im Zusammenhang mit der Regulation der Neuroinflammation nach einem SHT und verstärken neurotoxische Effekte (283). Hohe Spiegel dieser Zytokine sind eng mit einer Störung der BHS sowie einem Zelluntergang nach SHT verbunden (284). Um auch diese Ergebnisse in der hier vorliegenden Arbeit nachzuempfinden, wurde aus durch Kryosektion gewonnenes Hirnmaterial RNA extrahiert, diese in cDNA umgeschrieben, die interessierenden Gensequenzen mittels PCR vervielfacht und auf PPIA normalisiert. Alle bestimmten Gene (außer c-Fos) wurden in der CCI und CCI + FF-Gruppe im Vergleich zur FF und Sham-Gruppe hochreguliert. Allerdings konnte

kein Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ausgemacht werden. Somit gelang kein Nachweis eines Einflusses der FF auf die durch das CCI induzierte Genexpression.

Möglicherweise fand die Hochregulation der Entzündungsreaktion bei den Polytraumamäusen zu einem Zeitpunkt statt, davor dem Beobachtungszeitpunkt am Tag 5 *post trauma* lag. Daher wäre bei zukünftigen Studien eine Genexpressionsanalyse zu einem früheren Zeitpunkt vorstellbar. Zudem wären erweiterte Analyseverfahren denkbar. Hellewell et al. konnten in ihrer Studie aus dem Jahr 2016 erhöhte Inflammationsmarker im Liquor der Versuchstiere nachweisen (117). Vielleicht wäre eine Messung der Zytokine im Liquor zusätzlich zur Bestimmung der Genexpression im Gehirngewebe sinnvoll.

7.6 Bewertung des enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

Wenn simultan zwei traumatische Regionen vorliegen, ließen Studien bislang vermuten, dass beide Traumata von zirkulierenden Immunzellen und freigesetzten Inflammationsmediatoren beeinflusst werden. Nach einer Verletzung und Entzündung findet nachgewiesen eine Hochregulation des Proteins Progranulin (PRGN) statt, welches neuroprotektive Eigenschaften besitzt und eine entzündungshemmende Wirkung nach experimentellen CCI zeigte (230, 285). Zudem konnte festgestellt werden, dass rekombinantes PRGN die Knochenregeneration und Osteoblastendifferenzierung durch Hemmung der TNF α -Signalübertragung positiv beeinflusst (249, 286).

Das extrazelluläre Matrixprotein Osteopontin (OPN) ist in den letzten Jahren als mögliche Option in der Therapie von Hirnläsionen diskutiert worden und wird in vielen Geweben von verschiedenen Zelltypen, wie beispielsweise den Makrophagen und/oder aktivierten Mikroglia exprimiert und ist bei der Ausbildung einer intakten Bluthirnschranke nach einem Hirnschaden beteiligt (252, 287-290). IL-1, TNF α und Wachstumsfaktoren stimulieren als inflammatorische Zytokine dabei primär die Bildung von Osteopontin (291-294). Dabei konnte eine hemmende Wirkung auf die Proliferation und Migration von Mikroglia in In-vitro-Studien gezeigt werden, allerdings fand bislang eine kontroverse Veröffentlichung von Studien zu den neuroprotektiven Eigenschaften von OPN sowohl in vitro (252, 295, 296) als auch in vivo (295, 297, 298) statt. Zudem wird OPN von Osteoblasten und Osteoklasten sezerniert, dient der Regulierung der Matrixmineralisierung und spielt eine wichtige Rolle im Knochenumbauzyklus (299). Daher erfolgte eine Analyse des Plasmaspiegels von Progranulin (PGRN) und Osteopontin (OPN/SPP1). Wie erwartet, konnte eine höhere PRGN-Plasmakonzentration bei Mäusen mit kombinierten Interventionen im Vergleich zu den FF- und Sham-Tieren nachgewiesen werden. Allerdings fand kein signifikanter Nachweis im Vergleich zu der CCI-Gruppe statt. Im Gegensatz zu den PRGN Spiegel ließen sich signifikant erhöhte OPN-Plasmaspiegel bei Polytrauma-Mäusen im Vergleich zu den Gruppen mit einem isolierten Trauma nachweisen, welches einen additiven Effekt der FF auf den CCI Schaden vermuten lässt.

Heutzutage werden bei der Behandlung sowie bei der Klassifikation von SHT-Patienten klinische neurologische Untersuchungen sowie je nach Schweregrad Schnittbildgebungen veranlasst, bislang aber noch keine Laborparameter verwendet (290). Auf der Suche nach einem Biomarker im Plasma, welcher zur Diagnose und Prognose von Schädelhirntraumata herangezogen werden kann, widmen sich Gao et al 2020 in einer Studie zu SHT bei Kindern dem Osteopontin (290). Gerade bei Kindern ist die Analyse von Osteopontin interessant, da in einem gesunden und jungen Gehirn die Konzentration von OPN vernachlässigbar ist. In der Regel sind Kinder, welche von einem SHT betroffen sind, gesund, daher kann davon ausgegangen werden, dass die Konzentration an gemessenem Osteopontin auch wirklich auf das SHT und die damit verbundenen Mechanismen zurückzuführen sind. Integrin transportiert OPN aus dem Gehirn ins Blut, sodass es hier nachweisbar ist. OPN hat den Vorteil, dass es in Bioflüssigkeiten beständig ist (290). Zudem findet sich in der Literatur Hinweise darauf, dass auch in Liquor von Patienten nach einem SHT-Trauma, eine erhöhte OPN Konzentration nachweisbar ist (290). Es bleibt also spannend, welche Rolle Osteopontin als Biomarker im Plasma und/oder im Liquor zukünftig in der Diagnostik von SHT spielen wird.

In der vorliegenden Studie konnten die zwei potenziell neuroprotektiven Mediatoren PGRN und OPN in erhöhten Plasmakonzentrationen bei Tieren mit kombinierten CCI und Femurfraktur nachgewiesen werden. Daher sind weitere Studien zur Stützung der Hypothese PGRN und OPN als nützliche Biomarker in Polytraumamodellen zu verwenden und dessen Verwendung im klinischen Alltag angeraten.

7.7 Schlussfolgerung

7.7.1 Auswirkungen der FF auf neurologische Defizite

Gerade junge Menschen unter 40 sind oft von einem Polytrauma im Zuge eines Unfalls betroffen (14, 177). Präklinische und innerklinische Verbesserungen haben über die Jahre dazu geführt, dass die Letalität dieser schwerst verletzten Patienten gesenkt werden konnte. Bei einer solchen Polytraumaverletzung kann es zu schwerwiegenden und langanhaltenden Defiziten kommen, die einen großen Einfluss auf die Lebensqualität, das Berufsleben und den sozio-ökonomischen Aspekt nehmen können (177, 206). Aber auch der demografische Wandel mit einer älter werdenden Gesellschaft beeinflusst die Inzidenz von Polytraumaverletzungen zunehmend. Hierbei spielen Stürze im häuslichen Umfeld eine große Rolle. Daher ist es wichtig, die Pathophysiologie bei simultan vorliegenden Traumata genauer zu betrachten und zu verstehen.

Die Resultate, dass

- CCI Tiere, die ursprünglich ein ähnlich hohes Defizit wie CCI + FF-Tiere im NSS verzeichneten, eine Regredienz ihres neurologischen Zustandes über die Zeit zeigten

- wohingegen bei den Polytraumatierte keine Erholung des Zustandes über den Beobachtungszeitraum von 5 Tagen festgestellt werden konnte
- die Polytrauma-Gruppe eine länger anhaltende schlechte motorische Leistung im Beinbelastungstest aufwies
- und eine Verringerung des Angstverhaltens der Interventionsgruppen im Open Field Test, welches zuvor im murinen CCI Modell anderer Studien beschrieben wurde (219, 272), beobachtet werden konnte

bestätigen die bereits in der Literatur suggerierten neurotoxischen Effekte der Femurfraktur auf das Outcome der Versuchstiere (17-19). Hierbei ließ sich beobachten, dass die Kombination einer Femurfraktur mit einem Schädelhirntrauma, eine Verschlechterung des neurologischen Outcomes der Versuchstiere bewirkte. Somit konnten die Vermutungen mit den Beobachtungen in Einklang gebracht werden und anhand der neuro-koordinativen bzw. motorischen Verhaltens abgebildet werden.

7.7.2 Auswirkung der FF auf das Läsionsvolumen und die Inflammation

Die neuronale Entzündungsreaktion spielt nach einem Trauma eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie und Erweiterung des sekundären Hirnschadens. Das zusammenfassende Ergebnis der

- quantitativen Ausmessung des Schadenbereichs der Nissl-Färbung,
- der Breitenmessung des Körnerzellbandes des Gyrus dentatus und
- der immunhistologischen Färbung von GFAP und Iba-1

ergeben eine Zunahme des histologischen Schadens im Gehirn der Maus. Hierbei ist anzunehmen, dass eine durch eine herabgesetzte Funktionalität der BHS bedingte, gesteigerte Inflammation im Gehirn und der damit verbundenen Invasion von Immunzellen eine vermehrte, periläsionale Astroglieose bewirkt. Dabei konnte eine signifikant gesteigerte Anzahl an GFAP und Iba-1 Zellen in der CCI und CCI + FF Gruppe festgestellt werden. Auch der Unterschied der GFAP Zellen zwischen der CCI und CCI + FF Gruppe ist nicht durch einen Zufall zu erklären. Somit sprechen die vorliegenden Ergebnisse für eine Zunahme des sekundären Hirnschadens sowie einer Aktivierung der Immunreaktion nach initialen SHT in Kombination mit einer Femurfraktur. Dass es auch bei einer isolierten Femurfraktur zu einer Steigerung der Gliazellen kommt, legt nahe, dass es höchstwahrscheinlich zu einer Wechselwirkung der Femurfraktur mit der neuronalen Inflammationsreaktion kommt. Betrachtet man die Ergebnisse der Verhaltenstests gemeinsam mit den histologischen Daten, decken diese sich mit Resultaten vorheriger Studien, in denen man annimmt, dass aktivierte Gliazellen bei polytraumatisierten Mäusen eine neuromotorische Beeinträchtigung auslösen (17-19).

7.7.3 Auswirkungen der FF auf die Genexpression

Einige Studien konnten eine Beeinflussung der Femurfraktur auf die Genexpression bei gleichzeitig vorliegenden CCI im Gehirn nachweisen (17, 18). Es zeigte sich, dass das in einigen tierexperimentellen Modellen postulierte schädigende und neurotoxisch-stimulierende Potenzial der Femurfraktur in der hier durchgeführten Studie für das Schädelhirntrauma-Modell nach 120 h

- anhand der Quantifizierung von pro-inflammatorischen Zytokinen, Komplementfaktoren, Markern von Mikroglia und Astrozyten
- mittels Proteinanalyse durch einen Immunoblot von GFAP im Hirngewebe

nicht bestätigt werden konnte. Zwar konnte eine gesteigerte Genexpression aller gemessenen Marker nachgewiesen werden, jedoch konnte kein Unterschied zwischen der Polytrauma-Gruppe und dem isolierten Trauma gefunden werden.

7.7.4 Auswirkungen der FF auf die Proteinkonzentration von PGRN und OPN im Plasma

Die Stimuli Inflammation und Verletzung sollen für eine Hochregulation von PGRN sorgen (285). Zudem zeigt es nach einem experimentellen SHT eine neuroprotektive und anti-inflammatorische Wirkung (230). Verschiedene Untersuchungen konnten eine Expression von OPN in verschiedenen Zellen nachweisen und eine inhibitorische Wirkung auf die Mikroglia Proliferation und Distribution zeigen (287, 288, 296). Die gesteigerte Proteinsynthese konnte durch die durchgeführten Untersuchungen von Plasma bestätigt werden.

- Es konnte mittels eines ELISA-Tests höhere PGRN Plasmaspiegel in Mäusen, die einer kombinierten Intervention unterlagen gegenüber FF und Sham-Tieren, gefunden werden
- Hierbei konnte kein Unterschied zwischen der CCI und CCI + FF-Gruppen festgestellt werden
- die Proteinkonzentration der durch einen ELISA-Test ermittelten OPN-Spiegel waren ebenfalls gesteigert
- hier konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den CCI und CCI + FF - Tieren gefunden werden

Somit konnte die Kernaussage, dass eine Femurfraktur zu einer erhöhten Konzentration von den Proteinen OPN und PGRN führen, durch die dargestellten Ergebnisse gestützt, wenn auch nicht bestätigt werden. Hierzu sind weitere Untersuchungen vonnöten.

8 Zusammenfassung

Das Ziel der Studie war es, frühe Wechselwirkungen eines kombinierten Schädelhirntraumas mit einer Femurfraktur im Mausmodell zu untersuchen. Diese Arbeit analysierte, ob es im tierexperimentellen Polytraumamodell nach initialem SHT zu einem nachweislich schädlichen Einfluss der FF auf den sekundären Hirnschaden kommt und inwieweit sich dies in dem Verhalten der Versuchstiere widerspiegelt.

Hierzu wurden 43 weibliche, 6 bis 8 Wochen alte weibliche Mäuse des Stammes C57/BL6 in Sham, CCI, FF und CCI + FF-Gruppen randomisiert zugeteilt. An Tieren der CCI und CCI + FF-Gruppe wurde in Anästhesie eine Kraniotomie vorgenommen und anschließend ein rechtsparietales Schädelhirntrauma mittels elektromagnetischen betriebenen Bolzens mit einer definierten Eindringtiefe gesetzt. Betäubten Tieren der FF und CCI + FF-Gruppe wurde mittels eines 200 g schweren Gewichts das linke Femur frakturiert. Nach Durchführung des Neurological Severity Scores sowie des Beinbelastungstests zu den Zeitpunkten präoperativ, 1 Tag, 3 Tage und 5 Tage nach der Intervention, wurden die Tiere nach einer Überlebensdauer von 5 Tagen euthanasiert und dekapitiert. Anschließend wurde Blut entnommen und die Gehirne bei -80 °C konserviert. Die Gehirne wurden mittels Kryosektion in 12 µm dünne Schnitte aufgearbeitet. Dabei wurde sowohl ipsi- als auch kontralateral Material für weitere Untersuchungen gewonnen. Die Schnitte wurden mittels Nissl Färbung und einer Doppelimmunhistofärbung (GFAP und Iba-1) weiterverarbeitet. Die Nissl Färbung diente der Quantifizierung des kortikalen Läsionsvolumens und des subkortikalen Substanzverlustes des Körnerzellbandes im Gyrus dentatus des Hippocampus. Mittels der Immunhistofärbung konnte das Inflammationsgeschehen, durch das vermehrte Expressieren von Astrozyten (GFAP) und Mikrogliazellen (Iba-1) sichtbar gemacht werden. Dem schloss sich eine Genexpressionsanalyse proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor-alpha und Interleukin-1-beta, Komplementfaktoren C1QA, C2 sowie C3 Marker für die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten an. Hierfür wurden aus den mit der Kryosektion gewonnen Trimschnitte RNA extrahiert und diese in cDNA umgeschrieben und auf PPIA normalisiert. Um eine Proteinanalyse im periläsionalen Hirngewebe durchzuführen, wurde eine weitere Untersuchung zum Nachweis von GFAP durchgeführt. Diese erfolgte mit den zuvor gewonnen Trimschnitten und einem Immunoblot. Als letzte Analyse wurde ein enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) zur Bestimmung der Proteine Progranulin und Osteopontin im Plasma durchgeführt.

Die Untersuchungen zeigten gruppenübergreifend eine deutliche verhaltensbiologische (NSS) bzw. motorische Einschränkung (BSS) nach den Interventionen. Je nach Gruppenzugehörigkeit fand eine zeitnahe (CCI + FF) Erholung über den Beobachtungszeitraum von 5 Tagen statt, bzw. es war keine Regredienz der erhobene Parameter (CCI + FF) zu beobachten. In der histologischen Untersuchung konnte keine

signifikante Reduktion des Läsionsvolumen der Polytraumatierte gegenüber der CCI-Gruppe nach 120 h festgestellt werden. Allerdings konnte ein signifikanter Substanzverlust im Gyrus Dentatus in der CCI + FF-Gruppe beobachtet werden. Die quantitative Überprüfung der Gliazellen zeigte nach 120 h eine signifikante Erhöhung von GFAP und Iba-1 der CCI und CCI + FF-Gruppe gegenüber der Sham und FF-Gruppe. Zudem konnte eine vermehrte Zellzahl an GFAP-Zellen in der CCI + FF-Gruppe im Vergleich zur CCI Gruppe festgestellt werden. Da auch eine isolierte Femurfraktur zu einer Steigerung der Gliazellen führt, liegt eine Wechselwirkung der Femurfraktur mit der Inflammationsreaktion im Gehirn nahe. Einen Einfluss auf die inflammatorische Reaktion ergab sich anhand der Expressionsanalysen von den oben genannten Molekülen nicht. Als mutmaßlicher Grund ist eine zu späte Analyse der Entzündungsreaktion anzunehmen, daher wäre eine frühere Genexpressionsanalyse in Zukunft wünschenswert.

Somit kann konkludiert werden, dass die Femurfraktur einen Einfluss auf die Expansion des sekundären Hirnschadens hat. Es war nach einer Kombination einer Femurfraktur mit einem CCI eine Verhaltensänderung sowie eine Zunahme des strukturellen Schadens zu beobachten. Zudem konnte ein Anstieg der periläsionalen Astrogliose festgestellt werden. Jedoch konnte keine Beeinflussung der Genexpression im Gehirn nachvollzogen werden, obwohl eine Zunahme der Plasmakonzentration von Progranulin und Osteopontin zu verzeichnen war.

Um die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zu verifizieren und auszuweiten, sind zukünftige Studien erforderlich. Deren Absichten sollten sein, die positiven und nachteiligen Auswirkungen unserer pathophysiologischen Beobachtungen zu untersuchen und zu prüfen, ob diese in der frühen Phase des CCIs und der ebenfalls vorliegenden Knochenfraktur eine therapeutische Relevanz aufweisen können.

9 Literaturverzeichnis

1. Organisation WH. https://www.who.int/gho/road_safety/mortality/en/ 2013 [
2. Ruchholtz S, Kühne CA, Siebert H. [Trauma network of the German Association of Trauma Surgery (DGU). Establishment, organization, and quality assurance of a regional trauma network of the DGU]. *Unfallchirurg*. 2007;110(4):373-9.
3. Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D, DGU AGPd. Epidemiologie des Schwerverletzten Eine prospektive Erfassung der präklinischen und klinischen Versorgung. *Der Unfallchirurg*. 2000;103(5):355-63.
4. Champion HR, Copes WS, Sacco WJ, Lawnick MM, Keast SL, Bain LW, Jr., et al. The Major Trauma Outcome Study: establishing national norms for trauma care. *J Trauma*. 1990;30(11):1356-65.
5. Bundesamt S. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Verkehrsunfaelle/inhalt.html> 2022 [
6. Pannen BH, Loop T. Evidence-based intensive care treatment of intracranial hypertension after traumatic brain injury. *Anaesthesist*. 2005;54(2):127-36.
7. Pannen BH, Loop T. [Evidence-based intensive care treatment of intracranial hypertension after traumatic brain injury]. *Anaesthesist*. 2005;54(2):127-36.
8. Rickels E, von Wild K, Wenzlaff P. Head injury in Germany: A population-based prospective study on epidemiology, causes, treatment and outcome of all degrees of head-injury severity in two distinct areas. *Brain Inj*. 2010;24(12):1491-504.
9. HJ O. Versorgung Polytraumatisierter im Internationalen Vergleich. *Unfallchirurg*. 1999.
10. G. R. Tscherne *Unfallchirurgie*: Springer Verlag; 1997.
11. Lehnert M. MI, Marx G., Muhl E., Zacharowski K. (eds). *Polytrauma. Die Intensivmedizin* [Internet]. 2015.
12. Prevention CfDCa. Measuring Healthy Days
Population Assessment of Health-Related Quality of Life. 2020(Atlanta, Georgia).
13. Oestern HJ, Tscherne H, Sturm J, Nerlich M. Classification of the severity of injury. *Unfallchirurg*. 1985;88(11):465-72.
14. R. L. Jahresbericht 2019 - TraumaRegister DGU. In: *Unfallchirurgie DGf*, editor. 2019.
15. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*. 2007;99(1):4-9.

16. S3 – Leitlinie Polytrauma / Schwerverletzten-Behandlung. Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie. 2016.
17. Yang L, Guo Y, Wen D, Yang L, Chen Y, Zhang G, et al. Bone Fracture Enhances Trauma Brain Injury. *Scand J Immunol.* 2016;83(1):26-32.
18. Shultz SR, Sun M, Wright DK, Brady RD, Liu S, Beynon S, et al. Tibial fracture exacerbates traumatic brain injury outcomes and neuroinflammation in a novel mouse model of multitrauma. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35(8):1339-47.
19. Suto Y NK, Ahmed SM, Jacovides C, Browne KD, Cognetti J, Weber MT, Johnson VE, Leone R, Kaplan LJ, Smith DH, Pascual JL. A concomitant bone fracture delays cognitive recovery from traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg.* 2018;85(2) 275-284.
20. Tsitsilonis S, Seemann R, Misch M, Wichlas F, Haas NP, Schmidt-Bleek K, et al. The effect of traumatic brain injury on bone healing: an experimental study in a novel in vivo animal model. *Injury.* 2015;46(4):661-5.
21. Brady RD, Grills BL, Church JE, Walsh NC, McDonald AC, Agoston DV, et al. Closed head experimental traumatic brain injury increases size and bone volume of callus in mice with concomitant tibial fracture. *Sci Rep.* 2016;6:34491.
22. Toffoli AM, Gautschi OP, Frey SP, Filgueira L, Zellweger R. From brain to bone: evidence for the release of osteogenic humoral factors after traumatic brain injury. *Brain Inj.* 2008;22(7-8):511-8.
23. Aschenbrenner IB, Peter. DGU Patienteninformation. Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie. 2012.
24. <https://www.dgu-online.de/patienten/haeufige-diagnosen/schwerverletzte/polytrauma.html> 2020 [
25. Wanner G, Trentz O. Klinische Akutversorgung des Polytraumatisierten. Unfallchirurgie München Jena: Urban & Fischer. 2003;71.
26. Baker SP, O'Neill B, Haddon W, Jr., Long WB. The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J Trauma.* 1974;14(3):187-96.
27. Flohe S, Buschmann C, Nabring J, Merguet P, Luetkes P, Lefering R, et al. [Definition of polytrauma in the German DRG system 2006. Up to 30% "incorrect classifications"]. *Unfallchirurg.* 2007;110(7):651-8.
28. (Hrsg.) OH. Das Polytrauma. Urban & Fischer, München. 2008.
29. Oestern HJ, Probst J. Unfallchirurgie in Deutschland: Bilanz und Perspektiven: Springer Berlin Heidelberg; 2013.

30. Tscherne H RG. Die Gesamtversorgung des polytraumatisierten Patienten. 1997;DGU Festschrift Teil II.
31. Tscherne H NM, Sturm JA Der schwerverletzte Patient - Prioritäten und Management. Hefte Unfallheilkunde 394-410. 1988.
32. Bleck TP. Tetanus: pathophysiology, management, and prophylaxis. Dis Mon. 1991;37(9):545-603.
33. Sournia JC. The Illustrated History of Medicine: Harold Starke; 1992.
34. GO H. Infektionen der Knochen und Gelenke in Traumatologie und Orthopädie: Elsevier GmbH Deutschland; 2004.
35. J. P. Unfallchirurgische Grundlagen. DGU Festschrift Teil I. 1997.
36. Regel G LP, Lehmann Uetal. Behandlung Polytraumatisierter - Eine vergleichende Analyse von 3406 Fällen zwischen 1972 und 1991. Unfallchirurg. 1993.
37. Lefering R, Nienaber U, Paffrath T. What is a seriously injured person? : Differentiated view of the severity of the injuries in a trauma patient. Unfallchirurg. 2017;120(10):898-901.
38. Lefering R, Nienaber U, Paffrath T. [What is a seriously injured person? : Differentiated view of the severity of the injuries in a trauma patient]. Unfallchirurg. 2017;120(10):898-901.
39. Seefelder C, Matzek N, Rossi R. Polytrauma: Bewertungsskalen. Notfallmedizin. 1988;14:227.
40. Pape HC, Lefering R, Butcher N, Peitzman A, Leenen L, Marzi I, et al. Neudefinition des Polytraumas ("Berlin Definition") anhand des Traumaregister DGU® – Ergebnis eines internationalen Konsensprozesses 2014 [
41. Malczyk A. Schwerstverletzungen. Gesamtverband der Deutschen Versicherungswirtschaft e V Unfallforschung der Versicherer. 2012;33.
42. Kerstin Auerbach DO, Michael Jänsch, Rolf Lefering. Medizinische Folgen von Straßenverkehrsunfällen: Drei Datenquellen, drei Methoden, drei unterschiedliche Ergebnisse? Bundesanstalt für Straßenwesen. 2009.
43. Lefering R. Abschätzung der Gesamtzahl Schwerstverletzter in Folge von Straßenverkehrsunfällen in Deutschland. Bundesanstalt für Straßenwesen. 2010.
44. <https://www.aaam.org/ais-2015-released/> Chicago: THE ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF AUTOMOTIVE MEDICINE; 2016 [
45. Gennarelli TA, Wodzin E. AIS 2005: a contemporary injury scale. Injury. 2006;37(12):1083-91.

46. Osler T, Baker SP, Long W. A modification of the injury severity score that both improves accuracy and simplifies scoring. *J Trauma*. 1997;43(6):922-5; discussion 5-6.
47. Kommission E. Entwicklung einer Strategie in Bezug auf schwere Verletzungen bei Verkehrsunfällen - MEMO. 2013.
48. <http://www.ag-polytrauma.de/forschung/sirs-und-sepsis-beim-polytrauma/>. 2020.
49. Gonschorek O, Tiemann A, Josten C. Pathophysiologische Versorgungskonzepte für den Schwerstverletzten. *Trauma und Berufskrankheit*. 2007;9(1):S23-S7.
50. Denk S, Weckbach S, Eisele P, Braun CK, Wiegner R, Ohmann JJ, et al. Role of Hemorrhagic Shock in Experimental Polytrauma. *Shock*. 2018;49(2):154-63.
51. Huber-Lang M. Sepsis nach Polytrauma. *Trauma und Berufskrankheit*. 2018;20(1):73-6.
52. Giannoudis PV HF, Pape HC. Inflammatory serum markers in patients with multiple trauma. Can they predict outcome? *IJ Bone Joint Surg Br* 86: 313–323. 2004.
53. Pape HC, Hildebrand F, Krettek C. [Decision making and and priorities for surgical treatment during and after shock trauma room treatment]. *Unfallchirurg*. 2004;107(10):927-36.
54. K D. *Klinische Chemie und Hämatologie*. Stuttgart: Thieme Verlag; 2006.
55. Aschenbrenner IB, Peter. Patienteninformation Schaedel-Hirn-Trauma. In: *Unfallchirurgie DGf*, editor.: <https://www.dgu-online.de/patienten/haeufige-diagnosen/schwerverletzte/schaedel-hirn-trauma.html>; 2012.
56. Schwendlinger KF, R.; Mauer, Max. S2 Leitlinie Schaedelhirntrauma Erwachsene. In: *Neurochirurgie DGf*, editor. 2015.
57. Tönnis W LF. Einteilung der gedeckten Hirnschädigungen. *Ärtliche Praxis München*. 1953.
58. W. T. Bewußtseinsstörungen bei intrakranieller Drucksteigerung. *Handbuch der Neurochirurgie*. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer; 1959.
59. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*. 1974;2(7872):81-4.
60. Jantzen J-P, Piek J. Leitlinien zur Primärversorgung von Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma. *NOTFALL MEDIZIN*. 1997:466-71.

61. Kraus JF, Black MA, Hessol N, Ley P, Rokaw W, Sullivan C, et al. The incidence of acute brain injury and serious impairment in a defined population. *Am J Epidemiol.* 1984;119(2):186-201.
62. Balestreri M, Czosnyka M, Chatfield DA, Steiner LA, Schmidt EA, Smielewski P, et al. Predictive value of Glasgow Coma Scale after brain trauma: change in trend over the past ten years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004;75(1):161-2.
63. Marion DW, Carlier PM. Problems with initial Glasgow Coma Scale assessment caused by prehospital treatment of patients with head injuries: results of a national survey. *J Trauma.* 1994;36(1):89-95.
64. Marmarou A, Lu J, Butcher I, McHugh GS, Murray GD, Steyerberg EW, et al. Prognostic value of the Glasgow Coma Scale and pupil reactivity in traumatic brain injury assessed pre-hospital and on enrollment: an IMPACT analysis. *J Neurotrauma.* 2007;24(2):270-80.
65. Van Aken H. RK, Zimpfer M., T. W. *Intensivmedizin.* Intensivmedizin, 2 überarbeitete Auflage. 2. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2007.
66. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22(9):391-7.
67. Engelhard K, Müller-Forell W, Werner C. [Therapy of head trauma]. *Anaesthesist.* 2008;57(12):1219-31.
68. Zetterberg H, Smith DH, Blennow K. Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(4):201-10.
69. Blennow K, Hardy J, Zetterberg H. The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. *Neuron.* 2012;76(5):886-99.
70. Smith DH, Meaney DF, Shull WH. Diffuse axonal injury in head trauma. *J Head Trauma Rehabil.* 2003;18(4):307-16.
71. Selassie AW, McCarthy ML, Ferguson PL, Tian J, Langlois JA. Risk of posthospitalization mortality among persons with traumatic brain injury, South Carolina 1999-2001. *J Head Trauma Rehabil.* 2005;20(3):257-69.
72. Adams JH, Jennett B, Murray LS, Teasdale GM, Gennarelli TA, Graham DI. Neuropathological findings in disabled survivors of a head injury. *J Neurotrauma.* 2011;28(5):701-9.
73. Woltmann A, Bühren V. Das Stufenkonzept der Polytraumaversorgung. *Intensivmedizin und Notfallmedizin.* 2007;44:498-506.

-
74. Moore EE, Burch JM, Franciose RJ, Offner PJ, Biffi WL. Staged physiologic restoration and damage control surgery. *World J Surg.* 1998;22(12):1184-90; discussion 90-1.
 75. Stahel PF, Ertel W, Heyde CE. Einfluss des Schädel-Hirn-Traumas auf Zeitpunkt und Technik der Frakturversorgung. *Der Orthopäde.* 2005;34(9):852-64.
 76. Stahel PF, Ertel W, Heyde CE. Traumatic brain injury: impact on timing and modality of fracture care. *Orthopäde.* 2005;34(9):852-64.
 77. Riede UN SH. Allgemeine und spezielle Pathologie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verla; 1999.
 78. Laskowitz DG, G. Translational Research in Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Neuroscience.* 2016.
 79. Palmer AM, Marion DW, Botscheller ML, Bowen DM, DeKosky ST. Increased transmitter amino acid concentration in human ventricular CSF after brain trauma. *Neuroreport.* 1994;6(1):153-6.
 80. Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science.* 1989;244(4906):798-800.
 81. Zhang X, Chen Y, Jenkins LW, Kochanek PM, Clark RS. Bench-to-bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury. *Crit Care.* 2005;9(1):66-75.
 82. Thal SC, Neuhaus W. The blood-brain barrier as a target in traumatic brain injury treatment. *Arch Med Res.* 2014;45(8):698-710.
 83. Bullock R. Pathophysiological alterations in the central nervous system due to trauma. *Schweiz Med Wochenschr.* 1993;123(11):449-58.
 84. Czosnyka M, Czosnyka Z, Momjian S, Pickard JD. Cerebrospinal fluid dynamics. *Physiol Meas.* 2004;25(5):R51-76.
 85. 2008. BIH-WM-L-UH-W. Tierexperimentelle und klinische Untersuchungen zum Einsatz einer Thermodiffusionssonde zur kontinuierlichen Erfassung des regionalen cerebralen Blutflusses während milder Hyperventilation. Halle-Wittenberg2008.
 86. Hossmann KAS, F. J. . Experimental brain infarcts in cats. I. Pathophysiological observations. 1980.
 87. Cunningham AS, Salvador R, Coles JP, Chatfield DA, Bradley PG, Johnston AJ, et al. Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury. *Brain.* 2005;128(Pt 8):1931-42.

88. Golding EM, Robertson CS, Bryan RM, Jr. The consequences of traumatic brain injury on cerebral blood flow and autoregulation: a review. *Clin Exp Hypertens.* 1999;21(4):299-332.
89. O.I.Schmidt CEH, W.Ertel, and P.F.Stahel. Closed head injury--an inflammatory disease? 2005.
90. Neugebauer E, Hensler T, Rose S, Maier B, Holanda M, Raum M, et al. Severe craniocerebral trauma in multiple trauma. An assessment of the interaction of local and systemic mediator responses. *Unfallchirurg.* 2000;103(2):122-31.
91. Algattas H, Huang JH. Traumatic Brain Injury pathophysiology and treatments: early, intermediate, and late phases post-injury. *Int J Mol Sci.* 2013;15(1):309-41.
92. Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(10):734-44.
93. Barnum SR. Complement in central nervous system inflammation. *Immunol Res.* 2002;26(1-3):7-13.
94. Elward K, Gasque P. "Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Mol Immunol.* 2003;40(2-4):85-94.
95. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci.* 1995;18(2):83-8.
96. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Otto VI, Stahel PF, Kossmann T. Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. *Shock.* 2001;16(3):165-77.
97. Nataf S, Stahel PF, Davoust N, Barnum SR. Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? *Trends Neurosci.* 1999;22(9):397-402.
98. Louveau A, Harris TH, Kipnis J. Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends Immunol.* 2015;36(10):569-77.
99. Morganti-Kossmann MC, Satgunaseelan L, Bye N, Kossmann T. Modulation of immune response by head injury. *Injury.* 2007;38(12):1392-400.
100. Royo NC, Shimizu S, Schouten JW, Stover JF, McIntosh TK. Pharmacology of traumatic brain injury. *Curr Opin Pharmacol.* 2003;3(1):27-32.
101. Schmidt O, Infanger M, Heyde C, Ertel W, Stahel P. The Role of Neuroinflammation in Traumatic Brain Injury. *European Journal of Trauma.* 2004;30:135-49.

102. Schoettle RJ, Kochanek PM, Magargee MJ, Uhl MW, Nemoto EM. Early polymorphonuclear leukocyte accumulation correlates with the development of posttraumatic cerebral edema in rats. *J Neurotrauma*. 1990;7(4):207-17.
103. Shohami E, Beit-Yannai E, Horowitz M, Kohen R. Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17(10):1007-19.
104. Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T. The role of the complement system in traumatic brain injury. *Brain Res Brain Res Rev*. 1998;27(3):243-56.
105. Trembovler V, Beit-Yannai E, Younis F, Gallily R, Horowitz M, Shohami E. Antioxidants attenuate acute toxicity of tumor necrosis factor-alpha induced by brain injury in rat. *J Interferon Cytokine Res*. 1999;19(7):791-5.
106. Ghirnikar RS, Lee YL, Eng LF. Inflammation in traumatic brain injury: role of cytokines and chemokines. *Neurochem Res*. 1998;23(3):329-40.
107. Schmidt OIH, C.E; Ertel, W.; Stahel, P.F. Closed head injury--an inflammatory disease? 2005.
108. Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF. Closed head injury--an inflammatory disease? *Brain Res Brain Res Rev*. 2005;48(2):388-99.
109. Stahel PF EW. *Pathophysiologie des Traumas*. München: Urban & Fischer; 2004.
110. Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*. 2008;60(3):430-40.
111. Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol*. 2009;513(5):532-41.
112. Mittmann T, Sakry D. Gliazellen: Unterschätzte Gehirnzellen. *Dtsch Arztebl International*. 2016;113(15):[19].
113. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 2005;8(6):752-8.
114. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005;308(5726):1314-8.
115. Onyango IG, Jauregui GV, Čarná M, Bennett JP, Jr., Stokin GB. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Biomedicines*. 2021;9(5).
116. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011;91(2):461-553.

117. Hellewell S, Semple BD, Morganti-Kossmann MC. Therapies negating neuroinflammation after brain trauma. *Brain Res.* 2016;1640(Pt A):36-56.
118. Loane DJ, Byrnes KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics.* 2010;7(4):366-77.
119. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 2016;53(2):1181-94.
120. Fonseca MI, Zhou J, Botto M, Tenner AJ. Absence of C1q leads to less neuropathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2004;24(29):6457-65.
121. Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol.* 2016;173(4):692-702.
122. Weinhard L, di Bartolomei G, Bolasco G, Machado P, Schieber NL, Neniskyte U, et al. Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nat Commun.* 2018;9(1):1228.
123. Mittmann T, Sakry D. Gliazellen: Unterschätzte Gehirnzellen. *Dtsch Arztebl International.* 2016;113(15):[19].
124. Brett BL, Gardner RC, Godbout J, Dams-O'Connor K, Keene CD. Traumatic Brain Injury and Risk of Neurodegenerative Disorder. *Biol Psychiatry.* 2022;91(5):498-507.
125. Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* 2002;200(6):629-38.
126. Gundersen V, Storm-Mathisen J, Bergersen LH. Neuroglial Transmission. *Physiol Rev.* 2015;95(3):695-726.
127. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2016;275 Pt 3(0 3):305-15.
128. Martín-López E, García-Marques J, Núñez-Llaves R, López-Mascaraque L. Clonal Astrocytic Response to Cortical Injury. *PLOS ONE.* 2013;8(9):e74039.
129. Madathil SK, Carlson SW, Brelsfoard JM, Ye P, D'Ercole AJ, Saatman KE. Astrocyte-Specific Overexpression of Insulin-Like Growth Factor-1 Protects Hippocampal Neurons and Reduces Behavioral Deficits following Traumatic Brain Injury in Mice. *PLoS One.* 2013;8(6):e67204.
130. Villapol S, Byrnes KR, Symes AJ. Temporal dynamics of cerebral blood flow, cortical damage, apoptosis, astrocyte-vasculature interaction and astrogliosis in the pericontusional region after traumatic brain injury. *Front Neurol.* 2014;5:82.

-
131. Deller T, Haas CA, Frotscher M. Reorganization of the rat fascia dentata after a unilateral entorhinal cortex lesion. Role of the extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;911:207-20.
132. Chiu CC, Liao YE, Yang LY, Wang JY, Tweedie D, Karnati HK, et al. Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *J Neurosci Methods.* 2016;272:38-49.
133. Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain.* 2006;129(Pt 10):2761-72.
134. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017;541(7638):481-7.
135. Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity.* 2017;46(6):957-67.
136. Colton CA, Mott RT, Sharpe H, Xu Q, Van Nostrand WE, Vitek MP. Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J Neuroinflammation.* 2006;3:27.
137. Wahl P. Exercise is medicine: Die Rolle von Zytokinen und Myokinen für Gesundheit und Krankheit. Stuttgart, New York: © Georg Thieme Verlag KG; 2018. 153-9 p.
138. <https://flexikon.doccheck.com/de/Zytokine> 2018 [
139. Kline AE, Leary JB, Radabaugh HL, Cheng JP, Bondi CO. Combination therapies for neurobehavioral and cognitive recovery after experimental traumatic brain injury: Is more better? *Prog Neurobiol.* 2016;142:45-67.
140. Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics.* 2010;7(1):22-30.
141. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(5):878-88.
142. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest.* 2011;121(9):3375-83.
143. Riethmueller S, Ehlers JC, Lokau J, Düsterhöft S, Knittler K, Dombrowsky G, et al. Cleavage Site Localization Differentially Controls Interleukin-6 Receptor Proteolysis by ADAM10 and ADAM17. *Sci Rep.* 2016;6:25550.

-
144. Kanazawa M, Kawamura K, Takahashi T, Miura M, Tanaka Y, Koyama M, et al. Multiple therapeutic effects of progranulin on experimental acute ischaemic stroke. *Brain*. 2015;138(Pt 7):1932-48.
145. Zhu S, Tai C, Petkau TL, Zhang S, Liao C, Dong Z, et al. Progranulin promotes activation of microglia/macrophage after pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res*. 2013;1530:54-65.
146. Byrnes KR, Washington PM, Knobloch SM, Hoffman E, Faden AI. Delayed inflammatory mRNA and protein expression after spinal cord injury. *J Neuroinflammation*. 2011;8:130.
147. Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A. Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(7):999-1009.
148. Almeida S, Zhou L, Gao FB. Progranulin, a glycoprotein deficient in frontotemporal dementia, is a novel substrate of several protein disulfide isomerase family proteins. *PLoS One*. 2011;6(10):e26454.
149. He Z, Bateman A. Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis. *J Mol Med (Berl)*. 2003;81(10):600-12.
150. Kessenbrock K, Frohlich L, Sixt M, Lammermann T, Pfister H, Bateman A, et al. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *J Clin Invest*. 2008;118(7):2438-47.
151. Wang BC, Liu H, Talwar A, Jian J. New discovery rarely runs smooth: an update on progranulin/TNFR interactions. *Protein & cell*. 2015;6(11):792-803.
152. Tang W, Lu Y, Tian QY, Zhang Y, Guo FJ, Liu GY, et al. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science*. 2011;332(6028):478-84.
153. Tanaka Y, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M. Exacerbated inflammatory responses related to activated microglia after traumatic brain injury in progranulin-deficient mice. *Neuroscience*. 2013;231:49-60.
154. Lim HY, Albuquerque B, Häussler A, Myrczek T, Ding A, Tegeder I. Progranulin contributes to endogenous mechanisms of pain defense after nerve injury in mice. *J Cell Mol Med*. 2012;16(4):708-21.
155. Li B, He Y, Xu L, Hu Q, Tang J, Chen Y, et al. Progranulin Reduced Neuronal Cell Death by Activation of Sortilin 1 Signaling Pathways After Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Crit Care Med*. 2015;43(8):e304-e11.

-
156. Woodcock T, Morganti-Kossmann MC. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Front Neurol.* 2013;4:18.
157. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3-11.
158. Harwood SM, Yaqoob MM, Allen DA. Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. *Ann Clin Biochem.* 2005;42(Pt 6):415-31.
159. Probst C, Mirzayan MJ, Mommsen P, Zeckey C, Tegeder T, Geerken L, et al. Systemic inflammatory effects of traumatic brain injury, femur fracture, and shock: an experimental murine polytrauma model. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:136020.
160. Ritzel RM, Doran SJ, Barrett JP, Henry RJ, Ma EL, Faden AI, et al. Chronic Alterations in Systemic Immune Function after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2018;35(13):1419-36.
161. https://flexikon.doccheck.com/de/Oxidativer_Burst. 2020.
162. al. BCe. Frakturenlehre. In: Unfallchirurgie. Berlin, Heidelberg: Springer; 1982.
163. Junqueira LC, Carneiro J. Histologie - Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histophysiologie: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1996.
164. Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998(355 Suppl):S56-65.
165. Schiebler TH SW. Anatomie. Berlin: Springer Verlag; 2003.
166. https://www.amboss.com/de/wissen/Allgemeine_Frakturlehre 2020 [
167. Schenk R WH. Morphological findings in primary fracture healing. *Symp Biol Hung.* 1967.
168. Rüter A TO, Wagner M. Unfallchirurgie: Urban & Fischer bei Elsevier; 2003.
169. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT. A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res.* 1993;11(2):305-12.
170. Manigrasso MB, O'Connor JP. Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma.* 2004;18(10):687-95.
171. (DGU) ASdDGfrU. Das Traumaregister der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie. *Unfallchirurg.* 1994;97: 230-237.
172. Nast-Kolb D, Ruchholtz S, Oestern HJ, Neugebauer E, Arbeitsgemeinschaft Polytrauma der DGU. Das Traumaregister der Arbeitsgemeinschaft Polytrauma der

- Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie. Notfall & Rettungsmedizin. 2000;3(3):147-50.
173. <http://www.traumaregister-dgu.de/index.php?id=142> 2020 [
174. R. L. Jahresbericht 2021 - TraumaRegister DGU. 2021.
175. Haas NP, von Fournier C, Tempka A, Südkamp NP. Trauma center 2000. How many and which trauma centers does Europe need around the year 2000? Unfallchirurg. 1997;100(11):852-8.
176. Kühne CA, Ruchholtz S, Buschmann C, Sturm J, Lackner CK, Wentzensen A, et al. Trauma centers in Germany. Status report. Unfallchirurg. 2006;109(5):357-66.
177. Debus F, Lefering R, Frink M, Kühne CA, Mand C, Bücking B, et al. Numbers of Severely Injured Patients in Germany. Deutsches Aerzteblatt Online. 2015.
178. Unfallchirurgie DGf. Jahresbericht 2019 - TraumaRegister DGU. 2019.
179. http://www.traumanetzwerk-dgu.de/de/startseite_tnw.html 2020 [
180. Braun Rea. Facharztprüfung Anästhesie2017.
181. Organization WH. Global Status Report on road safety. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data:; 2013.
182. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/158050/umfrage/anzahl-der-verkehrsunfaelle-mit-todesfolge/> 2020 [
183. Wick ME, A.; Muhr, G. Epidemiologie Des Polytraumas. Der Chirurg, Springer Verlag. 1997;68; 1053-1058.
184. Nast-Kolb MBUOCWD. Epidemiologie des Schwerverletzten. Unfallchirurg, Springer Verlag. 2000;103; 355-363.
185. Rupert Kisser AW, Wim Rogmans³, Samantha Turner, Ronan A Lyons. Injuries in the European Union 2013-2015. European Association for Injury Prevention and Safety Promotion (EuroSafe), www.eurosafe.eu.com. 2017;6th edition.
186. EU. Verkehrsunfallstatistik 2020. 2020.
187. R. L. Revised injury severity classification (RISC) - development and validation of a classification system of severely injured patients based on a large trauma registry 2007.
188. Global Status Report on Road Safety 2018 [
189. JW. HS. Intensivmedizin Up2date. Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag KG; 2012.
190. Zweckberger K, Erös C, Zimmermann R, Kim SW, Engel D, Plesnila N. Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice. J Neurotrauma. 2006;23(7):1083-93.

-
191. Foundation TBT. Guidelines for Prehospital Management of Traumatic Brain Injury 2nd Edition 2007 01.04.2016. Available from: https://www.braintrauma.org/uploads/03/08/Prehospital_Guidelines_2nd_Edition_2.pdf. 2016 [
192. Prof. Dr. med. J. Meixensberger DmMS. <https://www.dgnc.de/gesellschaft/fuer-patienten/intrakranieller-druck/> [
193. Farahvar A, Gerber LM, Chiu YL, Härtl R, Froelich M, Carney N, et al. Response to intracranial hypertension treatment as a predictor of death in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2011;114(5):1471-8.
194. Nizamutdinov D, Shapiro LA. Overview of Traumatic Brain Injury: An Immunological Context. *Brain Sci.* 2017;7(1).
195. Stocchetti N, Zanier ER. Chronic impact of traumatic brain injury on outcome and quality of life: a narrative review. *Crit Care.* 2016;20(1):148.
196. Jiang JY, Gao GY, Li WP, Yu MK, Zhu C. Early indicators of prognosis in 846 cases of severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2002;19(7):869-74.
197. W. O. Prognosefaktoren des schweren Schädel-Hirn-Traumas. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie.* 2004.
198. Murray GD, Butcher I, McHugh GS, Lu J, Mushkudiani NA, Maas AI, et al. Multivariable prognostic analysis in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. *J Neurotrauma.* 2007;24(2):329-37.
199. Jennett B, Bond M. Assessment of outcome after severe brain damage. *Lancet.* 1975;1(7905):480-4.
200. K. Zaucha DLFCMRFARLHLDKMBDHNMMJ. Neuropsychological, psychosocial and vocational correlates of the Glasgow Outcome Scale at 6 months post injury: a study of moderate to severe traumatic brain injury patients. *Brain Injury.* 1998;12(7):555-67.
201. Obertacke U, Neudeck F, Wihs HJ, Schmit-Neuerburg KP. [Emergency care and treatment costs of polytrauma patients]. *Langenbecks Archiv für Chirurgie Supplement Kongressband Deutsche Gesellschaft für Chirurgie Kongress.* 1996;113:641-5.
202. www.destatis.de 2008 [
203. HJ O. Versorgung Polytraumatisierter im Internationalen Vergleich. *Unfallchirurg.* 1999.
204. Ruchholtz S, N-KD, Waydhas C., Stuber R, Lewan U., Schweiberer L. Cost analysis of clinical treatment of polytrauma patients. *1 Chirurg.* 1995;66(7):684-692.

-
205. Kinzl L GF, Arand M. Polytrauma and economics. Unfallchirurgie München Jena: Urban & Fischer. 1996.
206. Rosch M. KT, Leidl R., Gebhard F., Kinzl L., Ebinger T. Cost analysis of the treatment of patients with multiple trauma. 1 Unfallchirurg. 2000;103(8):632-639.
207. WHO Road Traffic - Injury Prevention. 2006;<https://www.who.int/publications-detail/world-report-on-road-traffic-injury-prevention>.
208. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. Lancet. 1997;349(9064):1498-504.
209. Marklund N, Hillered L. Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: where do we go from here? Br J Pharmacol. 2011;164(4):1207-29.
210. Morganti-Kossmann MC, Yan E, Bye N. Animal models of traumatic brain injury: is there an optimal model to reproduce human brain injury in the laboratory? Injury. 2010;41 Suppl 1:S10-3.
211. Markram H. The blue brain project. Nat Rev Neurosci. 2006;7(2):153-60.
212. Teranishi K, Scultetus A, Haque A, Stern S, Philbin N, Rice J, et al. Traumatic brain injury and severe uncontrolled haemorrhage with short delay pre-hospital resuscitation in a swine model. Injury. 2012;43(5):585-93.
213. Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatman KE, Meaney DF, et al. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. J Neurotrauma. 1995;12(2):169-78.
214. Lighthall JW. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. J Neurotrauma. 1988;5(1):1-15.
215. Cernak I. Animal models of head trauma. NeuroRx. 2005;2(3):410-22.
216. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. J Orthop Res. 1984;2(1):97-101.
217. Holstein JH, Menger MD, Culemann U, Meier C, Pohlemann T. Development of a locking femur nail for mice. J Biomech. 2007;40(1):215-9.
218. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, et al. Development of a stable closed femoral fracture model in mice. J Surg Res. 2009;153(1):71-5.
219. Pöttker B, Stöber F, Hummel R, Angenstein F, Radyushkin K, Goldschmidt J, et al. Traumatic brain injury causes long-term behavioral changes related to region-specific increases of cerebral blood flow. Brain Struct Funct. 2017;222(9):4005-21.

-
220. Huang H, Cheng WX, Hu YP, Chen JH, Zheng ZT, Zhang P. Relationship between heterotopic ossification and traumatic brain injury: Why severe traumatic brain injury increases the risk of heterotopic ossification. *J Orthop Translat.* 2018;12:16-25.
221. Kilkenney C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010;8(6):e1000412.
222. Surgical technique guide
Mouse Screw.
223. Lezak KR, Missig G, Carlezon WA, Jr. Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues in clinical neuroscience.* 2017;19(2):181-91.
224. Bailey KR CJ. Anxiety-Related Behaviors in Mice, *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* Buccafusco JJ e, editor: Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009.
225. Deitch AD, Murray MR. The Nissl substance of living and fixed spinal ganglion cells. I. A phase contrast study. *J Biophys Biochem Cytol.* 1956;2(4):433-44.
226. Ulfig N. *Kurzlehrbuch Histologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2005.
227. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research.* 1998;57(1):1-9.
228. Stanly TA, Fritzsche M, Banerji S, Garcia E, Bernardino de la Serna J, Jackson DG, et al. Critical importance of appropriate fixation conditions for faithful imaging of receptor microclusters. *Biol Open.* 2016;5(9):1343-50.
229. Lin MS, Comings DE, Alfi OS. Optical Studies of the interaction of 4'-6'-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes. *Chromosoma.* 1977;60(1):15-25.
230. Menzel L KL, Friedrich C, Hummel R, Dangel L, Winter J, Schmitz K, Tegeder I, Schäfer MKE. Progranulin protects against exaggerated axonal injury and astrogliosis following traumatic brain injury. *Glia* 2017;65(2):278-292.
231. George Paxinos KBJF. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact:* Academic Press; 2008.
232. Krämer T, Grob T, Menzel L, Hirnet T, Griemert E, Radyushkin K, et al. Dimethyl fumarate treatment after traumatic brain injury prevents depletion of antioxidative brain glutathione and confers neuroprotection. *J Neurochem.* 2017;143(5):523-33.
233. Schaible EV WJ, Bobkiewicz W, Kaburov Y, Dangel L, Krämer T, Huang C, Sebastiani A, Luh C, Werner C, Engelhard K, Thal SC, Schäfer MK. 2-

Methoxyestradiol confers neuroprotection and inhibits a maladaptive HIF-1 α response after traumatic brain injury in mice. *J Neurochem.* 2014;129(6) 940-954.

234. Okamoto T, Okabe S. Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution. *Int J Mol Med.* 2000;5(6):657-9.

235. Rassow J HK, Netzker R, Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2008.

236. Russell Higuchi* GDPSWaRG. simultaneous amplification and detection of specific DNA sequenced. Nature Publishing Group. 1992.

237. Thal SC, Wyschkon S, Pieter D, Engelhard K, Werner C. Selection of endogenous control genes for normalization of gene expression analysis after experimental brain trauma in mice. *J Neurotrauma.* 2008;25(7):785-94.

238. Anne Sebastiani CGI, * Christian Werner, Michael K.E. Schäfer, Kristin Engelhard, and Serge C. Thal. Proneurotrophin Binding to P75 Neurotrophin Receptor (P75ntr) Is Essential for Brain Lesion Formation and Functional Impairment after Experimental Traumatic Brain Injury. *JOURNAL OF NEUROTRAUMA.* 2015.

239.

<https://next.amboss.com/de/article/Y60njS#Zaab232f44aa5d62b99a813df1147ea2e> 2020 [

240. He Z, Ong CH, Halper J, Bateman A. Progranulin is a mediator of the wound response. *Nat Med.* 2003;9(2):225-9.

241. Bateman A, Bennett HP. The granulin gene family: from cancer to dementia. *Bioessays.* 2009;31(11):1245-54.

242. Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, et al. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature.* 2006;442(7105):916-9.

243. Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, et al. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature.* 2006;442(7105):920-4.

244. Wils H, Kleinberger G, Pereson S, Janssens J, Capell A, Van Dam D, et al. Cellular ageing, increased mortality and FTLT-DP-associated neuropathology in progranulin knockout mice. *J Pathol.* 2012;228(1):67-76.

245. Liu CJ. Progranulin: a promising therapeutic target for rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.* 2011;585(23):3675-80.

-
246. Yin F, Banerjee R, Thomas B, Zhou P, Qian L, Jia T, et al. Exaggerated inflammation, impaired host defense, and neuropathology in progranulin-deficient mice. *J Exp Med*. 2010;207(1):117-28.
247. Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM, et al. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell*. 2002;111(6):867-78.
248. Guo F, Lai Y, Tian Q, Lin EA, Kong L, Liu C. Granulin-epithelin precursor binds directly to ADAMTS-7 and ADAMTS-12 and inhibits their degradation of cartilage oligomeric matrix protein. *Arthritis Rheum*. 2010;62(7):2023-36.
249. Zhao YP, Tian QY, Frenkel S, Liu CJ. The promotion of bone healing by progranulin, a downstream molecule of BMP-2, through interacting with TNF/TNFR signaling. *Biomaterials*. 2013;34(27):6412-21.
250. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *Faseb j*. 1993;7(15):1475-82.
251. Fatherazi S, Matsa-Dunn D, Foster BL, Rutherford RB, Somerman MJ, Presland RB. Phosphate regulates osteopontin gene transcription. *J Dent Res*. 2009;88(1):39-44.
252. Yu H, Liu X, Zhong Y. The Effect of Osteopontin on Microglia. *Biomed Res Int*. 2017;2017:1879437.
253. Gertten C, Flores Morales A, Holmin S, Mathiesen T, Nordqvist AC. Genomic responses in rat cerebral cortex after traumatic brain injury. *BMC Neurosci*. 2005;6:69.
254. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(2):128-42.
255. Osier ND, Dixon CE. The Controlled Cortical Impact Model: Applications, Considerations for Researchers, and Future Directions. *Frontiers in neurology*. 2016;7:134-.
256. Hall ED, Sullivan PG, Gibson TR, Pavel KM, Thompson BM, Scheff SW. Spatial and temporal characteristics of neurodegeneration after controlled cortical impact in mice: more than a focal brain injury. *J Neurotrauma*. 2005;22(2):252-65.
257. Pearn ML, Niesman IR, Egawa J, Sawada A, Almenar-Queralta A, Shah SB, et al. Pathophysiology Associated with Traumatic Brain Injury: Current Treatments and Potential Novel Therapeutics. *Cell Mol Neurobiol*. 2017;37(4):571-85.
258. Graham DI, Adams JH, Doyle D. Ischaemic brain damage in fatal non-missile head injuries. *J Neurol Sci*. 1978;39(2-3):213-34.

-
259. Graham DI, Ford I, Adams JH, Doyle D, Teasdale GM, Lawrence AE, et al. Ischaemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1989;52(3):346-50.
260. Golz C, Kirchhoff FP, Westerhorstmann J, Schmidt M, Hirnet T, Rune GM, et al. Sex hormones modulate pathogenic processes in experimental traumatic brain injury. *J Neurochem*. 2019;150(2):173-87.
261. Lu C, Hansen E, Sapozhnikova A, Hu D, Miclau T, Marcucio RS. Effect of age on vascularization during fracture repair. *J Orthop Res*. 2008;26(10):1384-9.
262. Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, et al. Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res*. 2005;23(6):1300-7.
263. Hildebrand F, Giannoudis PV, van Griensven M, Chawda M, Pape HC. Pathophysiologic changes and effects of hypothermia on outcome in elective surgery and trauma patients. *Am J Surg*. 2004;187(3):363-71.
264. Malone DL, Kuhls D, Napolitano LM, McCarter R, Scalea T. Back to basics: validation of the admission systemic inflammatory response syndrome score in predicting outcome in trauma. *J Trauma*. 2001;51(3):458-63.
265. Campos-Pires R, Armstrong SP, Sebastiani A, Luh C, Gruss M, Radyushkin K, et al. Xenon improves neurologic outcome and reduces secondary injury following trauma in an in vivo model of traumatic brain injury. *Critical care medicine*. 2015;43(1):149-58.
266. Tsenter J, Beni-Adani L, Assaf Y, Alexandrovich AG, Trembovler V, Shohami E. Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *J Neurotrauma*. 2008;25(4):324-33.
267. Khalin I, Jamari NLA, Razak NBA, Hasain ZB, Nor MABM, Zainudin MHBA, et al. A mouse model of weight-drop closed head injury: emphasis on cognitive and neurological deficiency. *Neural regeneration research*. 2016;11(4):630-5.
268. Timaru-Kast R, Luh C, Gotthardt P, Huang C, Schäfer MK, Engelhard K, et al. Influence of age on brain edema formation, secondary brain damage and inflammatory response after brain trauma in mice. *PloS one*. 2012;7(8):e43829-e.
269. Huang C, Sakry D, Menzel L, Dangel L, Sebastiani A, Krämer T, et al. Lack of NG2 exacerbates neurological outcome and modulates glial responses after traumatic brain injury. *Glia*. 2016;64(4):507-23.

-
270. Zhang L ST, Zhang ZG, Jiang Q, Arniego P, Li Q, Lu M, Chopp M. A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Methods*. 2002;117:207–214.
271. Bouet V, Boulouard M, Toutain J, Divoux D, Bernaudin M, Schumann-Bard P, et al. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat Protoc*. 2009;4(10):1560-4.
272. Popovitz J, Mysore SP, Adwanikar H. Long-Term Effects of Traumatic Brain Injury on Anxiety-Like Behaviors in Mice: Behavioral and Neural Correlates. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2019;13:6-.
273. Hovens IB, Schoemaker RG, van der Zee EA, Absalom AR, Heineman E, van Leeuwen BL. Postoperative cognitive dysfunction: Involvement of neuroinflammation and neuronal functioning. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2014;38:202-10.
274. Franck M, Nerlich K, Neuner B, Schlattmann P, Brockhaus W, Spies C, et al. No convincing association between post-operative delirium and post-operative cognitive dysfunction: a secondary analysis. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. 2016;60(10):1404-14.
275. Helmy A, Antoniadou CA, Guilfoyle MR, Carpenter KL, Hutchinson PJ. Principal component analysis of the cytokine and chemokine response to human traumatic brain injury. *PLoS One*. 2012;7(6):e39677.
276. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996;19(8):312-8.
277. Chen MK, Guilarte TR. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther*. 2008;118(1):1-17.
278. Graeber MB. Changing face of microglia. *Science*. 2010;330(6005):783-8.
279. Ziebell JM, Taylor SE, Cao T, Harrison JL, Lifshitz J. Rod microglia: elongation, alignment, and coupling to form trains across the somatosensory cortex after experimental diffuse brain injury. *J Neuroinflammation*. 2012;9:247.
280. Cao T, Thomas TC, Ziebell JM, Pauly JR, Lifshitz J. Morphological and genetic activation of microglia after diffuse traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience*. 2012;225:65-75.
281. Hall J, Llewellyn A, Palmer S, Rowett-Harris J, Atkins RM, McCabe CS. Sensorimotor dysfunction after limb fracture - An exploratory study. *Eur J Pain*. 2016;20(9):1402-12.

-
282. Zhu YJ, Peng K, Meng XW, Ji FH. Attenuation of neuroinflammation by dexmedetomidine is associated with activation of a cholinergic anti-inflammatory pathway in a rat tibial fracture model. *Brain Res.* 2016;1644:1-8.
283. Lu D, Goussev A, Chen J, Pannu P, Li Y, Mahmood A, et al. Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2004;21(1):21-32.
284. Shohami E, Gallily R, Mechoulam R, Bass R, Ben-Hur T. Cytokine production in the brain following closed head injury: dexanabinol (HU-211) is a novel TNF-alpha inhibitor and an effective neuroprotectant. *J Neuroimmunol.* 1997;72(2):169-77.
285. Eriksen JL, Mackenzie IR. Progranulin: normal function and role in neurodegeneration. *J Neurochem.* 2008;104(2):287-97.
286. Wang N, Zhang J, Yang JX. Growth factor progranulin blocks tumor necrosis factor- α -mediated inhibition of osteoblast differentiation. *Genetics and Molecular Research.* 2016;15.
287. Brown A. OSTEOPONTIN: A KEY LINK BETWEEN IMMUNITY, INFLAMMATION AND THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Transl Neurosci.* 2012;3(3):288-93.
288. Doyle KP YT, Lessov NS, Ciesielski TM, Stevens SL, Simon RP, King JS, Stenzel-Poore MP. Nasal administration of osteopontin peptide mimetics confers neuroprotection in stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2008;Jun;28(6) 1235-1248.
289. Rosmus DD, Lange C, Ludwig F, Ajami B, Wieghofer P. The Role of Osteopontin in Microglia Biology: Current Concepts and Future Perspectives. *Biomedicines.* 2022;10(4).
290. Gao N, Zhang-Brotzge X, Wali B, Sayeed I, Chern JJ, Blackwell LS, et al. Plasma osteopontin may predict neuroinflammation and the severity of pediatric traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2020;40(1):35-43.
291. Wang X, Loudon C, Yue TL, Ellison JA, Barone FC, Solleveld HA, et al. Delayed expression of osteopontin after focal stroke in the rat. *J Neurosci.* 1998;18(6):2075-83.
292. Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Gagnon RC, Feuerstein GZ. Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol.* 1994;23(2-3):103-14.

-
293. Liu T, McDonnell PC, Young PR, White RF, Siren AL, Hallenbeck JM, et al. Interleukin-1 beta mRNA expression in ischemic rat cortex. *Stroke*. 1993;24(11):1746-50; discussion 50-1.
294. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, et al. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke*. 1994;25(7):1481-8.
295. Jullienne A, Hamer M, Haddad E, Morita A, Gifford P, Hartman R, et al. Acute intranasal osteopontin treatment in male rats following TBI increases the number of activated microglia but does not alter lesion characteristics. *J Neurosci Res*. 2020;98(1):141-54.
296. Ladwig A, Walter HL, Hucklenbroich J, Willuweit A, Langen KJ, Fink GR, et al. Osteopontin Augments M2 Microglia Response and Separates M1- and M2-Polarized Microglial Activation in Permanent Focal Cerebral Ischemia. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:7189421.
297. Zhang W, Cui Y, Gao J, Li R, Jiang X, Tian Y, et al. Recombinant Osteopontin Improves Neurological Functional Recovery and Protects Against Apoptosis via PI3K/Akt/GSK-3 β Pathway Following Intracerebral Hemorrhage. *Med Sci Monit*. 2018;24:1588-96.
298. Topkuru BC, Altay O, Duris K, Krafft PR, Yan J, Zhang JH. Nasal administration of recombinant osteopontin attenuates early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2013;44(11):3189-94.
299. Dai B, Xu J, Li X, Huang L, Hopkins C, Wang H, et al. Macrophages in epididymal adipose tissue secrete osteopontin to regulate bone homeostasis. *Nat Commun*. 2022;13(1):427.

10 Danksagung

Herzlich danken möchte ich , Leiter der Arbeitsgruppe Neuroprotektion der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, für das Überlassen dieses interessanten Themas, sowie der vielen Ratschläge und Hilfestellungen.

, die mich über die gesamte Dauer dieser Arbeit betreut hat, möchte ich meinen ganz besonderen Dank aussprechen. Sie stand mir bei den Versuchen tatkräftig zur Seite und übernahm die statistische Aufarbeitung der Daten. Ein großer Dank gilt Ihrer ruhigen, gelassenen Art und dem ein oder anderen Kaffeeklatsch, der jeden Laborbesuch zu etwas Besonderem gemacht hat.

, , und von der Forschungsgruppe Neuroprotektion möchte ich für das produktive und freundliche Arbeitsumfeld sowie für die Übernahme von (Teil-)Schritten dieser Arbeit danken.

Ich danke meiner und meiner langjährigen Freundin. , für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ich hätte mir Lehrerinnen wie Sie in meiner Schulzeit gewünscht, vielleicht würden mir dann heute Teile der deutschen Grammatik weniger Kopfzerbrechen bereiten.

Auch meinen ältesten Freundinnen und gehört ein Dank ausgesprochen für das Nichtübelnehmen der vielen Absagen und die Unterstützung in den letzten Zügen meiner Doktorarbeit. Ich danke Elena Fabritius für unsere seit der Schulzeit bestehende Freundschaft und den großartigen Urlaub, den wir vor dem Schreiben dieser Arbeit verbrachten, welcher mich fokussieren und durchhalten ließ.

Ich möchte mich auch bei meiner langjährigen Studienfreundin, Mitbewohnerin bedanken, ohne Sie wäre das Studium nur halb so schön geworden. Ich möchte mich für all unsere - fast schon unzähligen - gemeinsamen Reisen bedanken und auch ein Dank an Ihre tolle rheinländische Familie, die mich ohne Wenn und Aber aufgenommen haben, aussprechen. Meinen FreundInnen. , , und gebührt ebenfalls ein aufrichtiges Dankeschön für diese außergewöhnliche Studienzeit. Auch der restlichen, hier nicht aufgeführten Meenzer Truppe gebührt mein Dank. Ich halte jede unserer Unternehmungen, Ausflüge und Partys in bester Erinnerung und hoffe, dass ihr mich auf meinem weiteren Lebensweg begleiten werdet.

Ich danke der gesamten. , die mich über viele Jahre begleiteten. Liebe Familie. , Familie , Familie und Familie - ich bin dankbar dafür, dass Sie mir ein weiteres zuhause gegeben haben.

Ich möchte mich auch bei meinem Lebenspartner. für die Unterstützung und den Zuspruch während dieses Studiums und der Promotion bedanken, der die ganze Zeit erträglicher und lustiger machte. Er machte unsere gemeinsame Wohnung erst zu einem Zuhause und war über all die Zeit mein Anker. Danke für die vielen schönen Ablenkungen, deine Geduld, Ruhe

und das Aushalten meiner Launen. Ich freue mich auf unsere nächsten gemeinsamen Abenteuer!

Der größte und herzlichste Dank gilt meiner Schwester, mit meinem Schwager und deren Kinder. Sie haben mich in den letzten Jahren immer unterstützt und mir ein stabiles Umfeld gewährt. Ich bin sehr dankbar für die (fast) täglichen und stundenlangen Telefonate mit meiner besten Freundin. Auch in schwierigen Phasen war Sie immer ein motivierender und stärkender Rückhalt. Ohne sie wäre die Berufsausbildung, das Studium der Humanmedizin und der positive Abschluss dieser Promotion nicht möglich gewesen.

Ich widme dieser Arbeit meiner bereits viel zu früh verstorbenen Mutter, deren positiven Geist ich jeden Tag aufs Neue vermisse. Ich danke Ihr für all die Reisen, die schulische Ausbildung und die sportlichen Aktivitäten, die Sie mir ermöglicht hat. Ich danke Ihr für meinen spät lieb gewonnenen Pragmatismus, die Fähigkeit, ohne Angst an Neues ranzutreten und die Dinge so zu nehmen, wie sie kommen. Ich danke Ihr, für die Freude daran, Feste auszurichten, dafür, dass ich von Ihr gelernt habe, jeden Raum mit einem besonderen Ambiente versehen zu wollen und alle meine Freunde wie ein Schäferhund zusammenzutreiben - ob sie wollen oder nicht - so wie sie das immer getan hat. Ich danke Ihr für all die Erinnerungen und Erlebnisse, die ich für immer in meinem Herzen tragen werde und die mich zu der Frau haben werden lassen, die ich heute bin.

11 Lebenslauf

